



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

CONSERVAÇÃO *EX SITU* DO LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus*): DETERMINAÇÃO  
DE VALORES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISES SANGUÍNEAS E ANÁLISE DA  
MORFOMETRIA DA POPULAÇÃO DO CENTRO NACIONAL DE REPRODUÇÃO DO  
LINCE IBÉRICO

IVO TIAGO DOS SANTOS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Professora Doutora Graça Maria  
Alexandre Pires Lopes de Melo  
Professora Doutora Maria Teresa  
da Costa Mendes Vitor Villa de Brito  
Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

ORIENTADOR

Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

CO-ORIENTADOR

Professor Doutor Luís Manuel Madeira  
de Carvalho

2016  
LISBOA





**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

CONSERVAÇÃO *EX SITU* DO LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus*): DETERMINAÇÃO  
DE VALORES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISES SANGUÍNEAS E ANÁLISE DA  
MORFOMETRIA DA POPULAÇÃO DO CENTRO NACIONAL DE REPRODUÇÃO DO  
LINCE IBÉRICO

IVO TIAGO DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:**

Professora Doutora Graça Maria  
Alexandre Pires Lopes de Melo  
Professora Doutora Maria Teresa  
da Costa Mendes Vitor Villa de Brito  
Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

**ORIENTADOR**

Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

**CO-ORIENTADOR**

Professor Doutor Luís Manuel Madeira  
de Carvalho

2016

LISBOA

## AGRADECIMENTOS

Ao ICNF, ao Programa de reprodução ex situ do lince ibérico e ao Dr. Rodrigo Serra por me permitirem a oportunidade de fazer os estágio no CNRLI e pela cedência dos dados utilizados neste trabalho. Especialmente ao meu orientador, Dr. Rodrigo Serra, que me apresentou ao trabalho desenvolvido com esta espécie, e que desde o momento em que me aceitou como orientando foi uma grande fonte de conhecimento e de ajuda, sem os quais esta dissertação não seria possível. A todos os membros da equipa do CNRLI (Rodrigo Serra, Alexandre Azevedo, Nuno Gonçalves, Lara Ferreira, Lara Baptista, Andreia Grancho, Verónica Madeira, Vanessa Requeijão, Jan Valkenburg, Joana Pechém, Tiago Costa, Tiago Lopes e Nereida Sanchez) que me ajudaram a perceber e a integrar no árduo e nobre trabalho que se desenvolve todos os dias para que o futuro do lince ibérico seja mais animador. A todos eles, pelo carinho com que me receberam e trataram durante a temporada que passei no CNRLI, foram muitos e bons momentos que com eles vivi, e em que me fizeram verdadeiramente sentir em família. Aos voluntários com quem partilhei a casa e as horas de vigilância (Marta Bandeira, Bárbara, Raquel, Cátia, Ana Marques, Martinha, Sheila, Ana Esteves, Nádia, Miguel, Pedro, Luís, Ana Cunha, Ricardo, Sara, Márcia e Marta Cabaça) pelo companheirismo, amizade e momentos que ficam para recordar.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, por acreditar em mim e por me desafiar a fazer mais e melhor desde o momento em que me teve como aluno no 2º ano de faculdade. Pela paixão que tem pelos animais silvestres e por leccionar a cadeira opcional de Patologia e Clínica da Fauna Silvestre e Autóctone, que foi uma pedra basilar na minha escolha do tema para esta dissertação. Pela dedicação, compreensão e auxílio durante todo o processo de planeamento, concretização e finalização desta dissertação. Ao Professor Doutor Telmo Nunes, pela preciosa orientação através do complexo mundo da análise estatística. A todos os professores, médicos e profissionais que fazem parte da FMV-UL, pelo que me ensinaram ao longo dos anos que se passaram desde que me matriculei pela primeira vez.

Ao grupo FAUNA, a todos os membros passados, presentes e futuros, por criarem, manterem e fazerem crescer este núcleo, que me diz tanto e do qual tenho o orgulho de ter feito parte. Em especial meus aos companheiros da direção (Susana, Sara, Rafaela, Ana e Ricardo) pelos desafios que enfrentamos juntos e por aquilo que conquistámos.

Aos amigos que fiz durante o meu percurso académico, que têm o dom de tornar tudo mais simples, pelos bons momentos passados juntos, pelo apoio durante os maus. Pelos dias e noites de convívio ou de estudo. Em especial à minha namorada Sónia que desde que entrou na minha vida tornou o mundo um lugar melhor.

Ao meu grupo, por serem uma segunda família, por me ajudarem agora e para sempre a crescer como pessoa, em especial à Vera Alves, por encontrar a força necessária a manter-nos juntos e por ser um farol na minha vida.

A toda a minha família, pelo apoio e carinho com que me acompanharam ao longo de toda a vida. Em especial aos meus pais Paula e Fernando, e ao irmão Igor que sempre me apoiaram no sonho de ser Médico Veterinário e que sentiram através de mim as dificuldades deste percurso.

A toda a Natureza, por existir e por me inspirar, em especial ao lince ibérico cuja existência é a razão de ser desta dissertação.

# **CONSERVAÇÃO *EX SITU* DO LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus*): DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISES SANGUÍNEAS E ANÁLISE DA MORFOMETRIA DA POPULAÇÃO DO CENTRO NACIONAL DE REPRODUÇÃO DO LINCE IBÉRICO**

## **RESUMO**

O lince ibérico (*Lynx pardinus*) é uma espécie que se encontra ameaçada de extinção, que tem sido alvo de vários esforços para a sua conservação. É essencial para o bom funcionamento dos programas de conservação o conhecimento íntimo da espécie, pois só através deste é possível determinar as medidas correctas a adoptar.

Nesse sentido, o objectivo deste trabalho foi determinar os valores de referência das diferentes análises hematológicas realizadas durante as anestésias efectuadas no Centro Nacional de Reprodução do Lince Ibérico (CNRLI). Foram avaliados os dados recolhidos das análises efectuadas durante os primeiros cinco anos de funcionamento do centro. A par disso, foram também avaliados os dados de morfometria recolhidos neste mesmo período de tempo. Tanto o sangue recolhido para análise como os dados de morfometria foram recolhidos com os animais sob anestesia geral.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os valores das análises hematológicas da população de lince do CNRLI são na generalidade idênticos aos já determinados para outras populações de lince ibérico, nomeadamente em Espanha, sendo também muito semelhantes aos valores que se conhecem para o gato doméstico (*Felis catus*). Estes valores terão especial utilidade na medicina desenvolvida para a sua preservação, quer em programas de recuperação *in situ*, quer *ex situ*.

**Palavras-chave:** lince ibérico, conservação *ex situ*, hemograma, análises bioquímicas, proteínograma, morfometria, Portugal.



# **IBERIAN LYNX (*Lynx Pardinus*) EX SITU CONSERVATION: DETERMINATION OF THE REFERENCE VALUES FOR BLOOD TESTS AND MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE POPULATION FROM NATIONAL IBERIAN LYNX BREEDING CENTER**

## **ABSTRACT**

The iberian lynx (*Lynx pardinus*) is an endangered species and has been target of several efforts aiming its preservation. In order to make conservation programs work it is essential to know very well the species, since only with that knowledge it is possible to figure out how to act correctly.

Bearing this in mind, this research goal is to determine the reference values for the different blood tests taken during several anesthetics that took place in the Centro Nacional de Reprodução do Lince Ibérico (CNRLI, National Iberian Lynx Breeding Center). In this work, all the data resulting from blood tests collected during the first five working years of the center was taken in account and analyzed. Along with that, the morphometric data collected during that same time was also analyzed. All these data was collected from animals under general anesthesia.

The results of this research show that the blood values determined for the CNRLI population are in general identical to the same parameters determined in other Iberian lynx populations, namely in Spain. They are also very similar to the values known for domestic cat (*Felis catus*). These values will be particularly useful in the medicine developed for its preservation, both in recovery programs *in situ* and *ex situ*.

**Key words:** Iberian lynx, *ex situ* conservation, complete blood count, biochemical analysis, proteinogram, morphometrics, Portugal.





## ÍNDICE DE CONTEÚDOS

1. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. INTRODUÇÃO .....	3
2.2. CONSERVAÇÃO <i>EX-SITU</i> .....	4
2.3. PROJETO DE CONSERVAÇÃO DO LINCE IBÉRICO.....	4
2.3.1. PROJETO DE CONSERVAÇÃO EM ESPANHA .....	5
2.3.2. PROJETO DE CONSERVAÇÃO EM PORTUGAL.....	7
2.4. PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO <i>EX SITU</i> DO LINCE IBÉRICO .....	9
2.4.1. MANEIO GENÉTICO E DEMOGRÁFICO .....	9
2.4.2. COMPORTAMENTO E REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO .....	12
2.4.3. CRIA ARTIFICIAL.....	15
2.4.4. FISILOGIA REPRODUTIVA.....	16
2.4.5. REINTRODUÇÃO.....	19
2.4.6. SENSIBILIZAÇÃO E EDUCAÇÃO .....	22
2.5. MANEIO SANITÁRIO E ASPECTOS MÉDICO-VETERINÁRIOS.....	22
2.5.1. DOENÇAS INFECIOSAS .....	23
2.5.2. DOENÇAS NÃO-INFECIOSAS.....	26
2.6. ANESTESIA.....	27
2.6.1. PREPARAÇÃO.....	28
2.6.2. CONTENÇÃO.....	30
2.6.3. PROTOCOLOS ANESTÉSICOS .....	33
2.6.4. MANEIO DE UM ANIMAL ANESTESIADO.....	36
2.7. VALORES DE REFERÊNCIA .....	40
2.7.1. HEMOGRAMA E ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	40
2.7.2. MORFOMETRIA.....	42
3. OBJETIVOS.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. AMOSTRA .....	44
4.2. METODOLOGIA DE ANESTESIA E COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	46
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47

5. RESULTADOS.....	50
5.1. HEMOGRAMA .....	50
5.2. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	50
5.3. PROTEINOGRAMA.....	52
5.4. MORFOMETRIA .....	53
6. DISCUSSÃO.....	56
6.1. HEMOGRAMA .....	56
6.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	57
6.3. PROTEINOGRAMA.....	59
6.4. MORFOMETRIA .....	59
7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	60
8. BIBLIOGRAFIA.....	62
9. ANEXOS.....	70
ANEXO 1. HISTOGRAMAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO HEMOGRAMA .....	70
ANEXO 2. TABELAS DE VALORES DE PARÂMETROS DO HEMOGRAMA.....	74
ANEXO 3. HISTOGRAMAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NA ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	76
ANEXO 4. TABELAS DE VALORES DE PARÂMETROS DA ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	82
ANEXO 5. HISTOGRAMAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO PROTEINOGRAMA	83
ANEXO 6. TABELAS DE VALORES DE PARÂMETROS DO PROTEINOGRAMA.....	86

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Distribuição de frequências dos motivos primários para as anestésias realizadas no CNRLI.....	45
<b>Gráfico 2</b> - Distribuição de frequências das idades (em anos) dos lince anestesiados no CNRLI.....	45
<b>Gráfico 3</b> - Distribuição de frequências dos protocolos de indução anestésica utilizados....	47
<b>Gráfico 4</b> - Histograma da contagem de eritrócitos. ....	70
<b>Gráfico 5</b> - Histograma do doseamento de hemoglobina. ....	70
<b>Gráfico 6</b> - Histograma da medição de hematócrito. ....	70
<b>Gráfico 7</b> - Histograma da medição do VCM. ....	70
<b>Gráfico 8</b> - Histograma da medição da CHCM. ....	71
<b>Gráfico 9</b> - Histograma da medição da HCM.....	71
<b>Gráfico 10</b> - Histograma da contagem total de leucócitos. ....	71
<b>Gráfico 11</b> - Histograma da contagem percentual de linfócitos. ....	71
<b>Gráfico 12</b> - Histograma da contagem total de linfócitos. ....	72
<b>Gráfico 13</b> - Histograma da contagem percentual de monócitos. ....	72
<b>Gráfico 14</b> - Histograma da contagem total de monócitos.....	72
<b>Gráfico 15</b> - Histograma da contagem percentual de neutrófilos.....	72
<b>Gráfico 16</b> - Histograma da contagem total de neutrófilos.....	73
<b>Gráfico 17</b> - Histograma da contagem percentual de eosinófilos. ....	73
<b>Gráfico 18</b> - Histograma da contagem total de eosinófilos. ....	73
<b>Gráfico 19</b> - Histograma da contagem de plaquetas. ....	73
<b>Gráfico 20</b> - Histograma do doseamento de ácido úrico.....	76
<b>Gráfico 21</b> - Histograma do doseamento de albumina. ....	76
<b>Gráfico 22</b> - Histograma do doseamento da fosfatase alcalina. ....	76
<b>Gráfico 23</b> - Histograma do doseamento da amilase pancreática. ....	76
<b>Gráfico 24</b> - Histograma do doseamento da bilirrubina total.....	77
<b>Gráfico 25</b> - Histograma do doseamento de cálcio.....	77
<b>Gráfico 26</b> - Histograma do doseamento da CPK. ....	77
<b>Gráfico 27</b> - Histograma do doseamento de cloretos. ....	77
<b>Gráfico 28</b> - Histograma do doseamento de colesterol.....	78
<b>Gráfico 29</b> - Histograma do doseamento de creatinina. ....	78
<b>Gráfico 30</b> - Histograma do doseamento do fósforo.....	78
<b>Gráfico 31</b> - Histograma do doseamento da GGT.....	78
<b>Gráfico 32</b> - Histograma do doseamento da glucose.....	79
<b>Gráfico 33</b> - Histograma do doseamento do ferro. ....	79
<b>Gráfico 34</b> - Histograma do doseamento de LDH.....	79

<b>Gráfico 35</b> - Histograma do doseamento da lipase.....	79
<b>Gráfico 36</b> - Histograma do doseamento de magnésio. ....	80
<b>Gráfico 37</b> - Histograma do doseamento de proteínas totais.....	80
<b>Gráfico 38</b> - Histograma do doseamento de AST.....	80
<b>Gráfico 39</b> - Histograma do doseamento de ALT. ....	80
<b>Gráfico 40</b> - Histograma do doseamento de triglicéridos. ....	81
<b>Gráfico 41</b> - Histograma do doseamento de ureia. ....	81
<b>Gráfico 42</b> - Histograma do doseamento percentual de sero-albumina. ....	83
<b>Gráfico 43</b> - Histograma do doseamento total de sero-albumina.....	83
<b>Gráfico 44</b> - Histograma do doseamento percentual de alfa-1 globulina. ....	83
<b>Gráfico 45</b> - Histograma do doseamento total de alfa-1 globulina. ....	83
<b>Gráfico 46</b> - Histograma do doseamento percentual de alfa-2 globulina. ....	84
<b>Gráfico 47</b> - Histograma do doseamento total de alfa-2 globulina. ....	84
<b>Gráfico 48</b> - Histograma do doseamento percentual de beta globulina. ....	84
<b>Gráfico 49</b> - Histograma do doseamento total de beta globulina. ....	84
<b>Gráfico 50</b> - Histograma do doseamento percentual de gama globulina. ....	85
<b>Gráfico 51</b> - Histograma do doseamento total de gama globulina. ....	85
<b>Gráfico 52</b> - Histograma do quociente Sero-Albumina/Globulinas totais. ....	85

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Intervalos de referência para os diferentes parâmetros do hemograma.....	51
<b>Tabela 2</b> - Intervalos de referência para os diferentes parâmetros da análise bioquímica. .	52
<b>Tabela 3</b> - Intervalos de referência para os diferentes parâmetros do proteinograma.....	53
<b>Tabela 4</b> - Análise descritiva da morfometria para machos e fêmeas. ....	54
<b>Tabela 5</b> - Análise descritiva da morfometria para diferentes grupos etários. ....	55
<b>Tabela 6</b> - Valores crescentes da contagem total de monócitos (x/μL). ....	74
<b>Tabela 7</b> - Valores crescentes da contagem total de neutrófilos (x/μL). ....	74
<b>Tabela 8</b> - Valores crescentes da contagem total de eosinófilos (x/μL). ....	74
<b>Tabela 9</b> - Valores crescentes da contagem total de basófilos (x/μL). ....	74
<b>Tabela 10</b> - Valores crescentes da contagem de plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL). ....	75
<b>Tabela 11</b> - Valores crescentes da contagem percentual de reticulócitos (%). ....	75
<b>Tabela 12</b> - Valores crescentes da contagem total de reticulócitos (x/μL). ....	75
<b>Tabela 13</b> - Valores crescentes do doseamento da Lipase (UI/L). ....	82
<b>Tabela 14</b> - Valores crescentes doseamento de sero-albumina (%). ....	86
<b>Tabela 15</b> - Valores crescentes doseamento de alfa-1 globulina (%). ....	86
<b>Tabela 16</b> - Valores crescentes doseamento de alfa-2 globulina (%). ....	86
<b>Tabela 17</b> - Valores crescentes doseamento de beta globulina (%). ....	86
<b>Tabela 18</b> - Valores crescentes doseamento de gama globulina (%). ....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - por cento  
α - alfa  
µg - micrograma  
µL - microlitro  
ADN - ácido desoxirribonucleico  
ALT - alanina aminotransferase  
AST - aspartato aminotransferase  
ASVCP - *American Society for Veterinary Clinical Pathology* (Sociedade Americana para a Patologia Clínica Veterinária)  
BUT - butorfanol  
°C - grau Celsius  
CHCM - concentração corpuscular média de hemoglobina  
CDV - *Canine Distemper Virus* (Vírus da esgana)  
cm - centímetro  
CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono  
CPK - creatinina fosfoquinase  
CR - *Critically Endangered* (Criticamente em perigo)  
DEX - dexmedetomidina  
DGGMN - *Dirección General de Gestión de Medio Natural* (Direção Geral de Gestão do Meio Natural)  
dL - decilitro  
DRC - doença renal crónica  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
EN - *Endangered* (Em perigo)  
FCoV - *Feline Coronavirus* (Coronavírus Felino)  
FCV - *Feline Calicivirus* (Calicivírus Felino)  
FeLV - *Feline Leukemia Virus* (Vírus da Leucemia Felino)  
FFI - *Fauna & Flora International* (Fauna e Flora Internacional)  
FHV - *Feline Herpesvirus* (Herpesvírus Felino)  
FIV - *Feline Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Felina)  
fL - fentolitro  
FPV - *Feline Parvovirus* (Parvovírus Felino)  
G - distribuição normal ou gaussiana  
g - grama  
GMSLI - *Grupo de manejo sanitario del lince ibérico* (Grupo de manejo sanitário do lince ibérico)  
GAASLI - *Grupo Asesor de Aspectos Sanitarios del Lince Ibérico* (Grupo Assessor de Aspectos Sanitário do Lince Ibérico)  
GGT - gama-glutamil transferase  
HCM - hemoglobina corpuscular média  
ICNF - Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas  
IR - intervalo de referência  
IRIS - *International Renal Interest Society* (Sociedade Internacional de Interesse Renal)  
IUCN - *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais)  
KET - cetamina  
kg - quilograma  
L - litro  
LDH - lactato desidrogenase  
LPN - Liga de Proteção da Natureza  
MAOTE - Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e Energia  
MET - metadona  
MID - midazolan  
mg - miligrama

mmol - milimol  
N - número de dados  
NG - distribuição não normal/ não gaussiana  
NS - diferenças não significativas  
O<sub>2</sub> - oxigénio  
OR - *outliers* removidos  
PaCO<sub>2</sub> - pressão arterial parcial de dióxido de carbono  
PaO<sub>2</sub> - pressão arterial parcial de oxigénio  
PCO<sub>2</sub> - pressão parcial de dióxido de carbono  
PCELI - Programa de Conservación Ex-situ del Lince Ibérico  
pg - picograma  
PGFM - 3,14-dihidro-15-ceto-PGF2 $\alpha$   
S - diferenças significativas  
S-A/G-T - sero-albumina/globulinas totais  
SO<sub>2</sub> - saturação de oxigénio na hemoglobina  
UI - Unidade Internacional  
VCM - volume corpuscular médio  
VU - *vulnerable* (vulnerável)  
WAZA - *World Association of Zoos and Aquariums* (Associação Mundial de Zoos e Aquários)

## **1. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO**

O estágio curricular que serviu de base para a realização desta dissertação de mestrado decorreu no Centro Nacional de Reprodução de Lince Ibérico (CNRLI) em Silves, sob a orientação do Dr. Rodrigo Serra. O estágio teve início no dia 1 de Outubro de 2014, tendo terminado dia 30 de Abril de 2015.

Durante o período de estágio foi possível perceber a fundo o funcionamento de um programa de conservação *ex situ* e de um centro de reprodução em cativeiro de animais selvagens destinados à libertação em meio selvagem. As atividades desenvolvidas permitiram a consolidação de conhecimentos prévios e também a aquisição de novos conhecimentos no campo da sanidade e comportamento animal. Isto porque num programa de conservação onde o contacto com os animais deve ser mantido ao mínimo, estas são as ferramentas mais utilizadas por um médico veterinário para manter a saúde dos animais. Outras áreas em que os conhecimentos foram reforçados foram as da anestesiologia, medicina interna e imagiologia, uma vez que ao trabalhar com animais selvagens, todas as intervenções que envolvam o contato direto entre o animal e o médico veterinário têm de ser efetuadas com o animal sob o efeito de uma anestesia geral. A par disso a imagiologia prima como método de exploração pela grande quantidade de informação que fornece através de procedimentos não invasivos.

A principal atividade desenvolvida durante o estágio foi a videovigilância, efetuada através de camaras colocadas nos cercados permitindo uma observação dos lince 24 horas por dia. Através deste meio, participámos no apoio ao maneio diário dos tratadores, capturas e libertações de lince nos cercados, registo de etogramas destinados a todos os animais do centro e na avaliação de comportamentos de caça das crias destinadas a serem reintroduzidas.

Durante as diferentes fases da época reprodutiva, através da videovigilância, participámos também: no acompanhamento de interações entre casais de lince e das respetivas uniões, na observação e registo de sinais de cio comportamental, na quantificação e avaliação das cópulas, no acompanhamento das fêmeas gestantes, através do registo de comportamentos de preparação do local de parto e de sinais de início do parto, na vigilância de partos e avaliação da sua normalidade, no acompanhamento das crias e do seu desenvolvimento e na monitorização destas durante a fase de lutas.

Entre outras atividades desenvolvidas incluem-se: o acompanhamento e apoio da equipa médico-veterinária durante os procedimentos de captura, anestesia, exame de estado geral, exame reprodutor e recuperação anestésica, a participação no exame médico dos coelhos utilizados como presa viva para o lince à chegada ao centro, o auxílio durante um episódio de socorro a uma cria de lince recém-nascida, a colaboração durante os testes laboratoriais de diagnóstico de gestação e a assistência durante um evento de libertação por solta branda de dois lince em Mértola.



Como complemento ao estágio, foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, a pesquisa coprológica de parasitas presentes nas fezes de lince do CNRLI através dos métodos de flutuação, sedimentação e Baerman. Esta parte do trabalho foi efetuada sob a co-orientação do Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho.

Ao trabalhar com uma espécie como o lince ibérico, que se encontra em grande risco de extinção, é importante perceber que a vida de cada animal tem um impacto bastante significativo no panorama de conservação global da espécie. Assim, todo o manejo efetuado no do centro é pensado de forma a assegurar o melhor para o futuro do animal e da espécie, desde garantir que os adultos reprodutores têm todas as condições para se reproduzir de forma natural, até permitir às crias o desenvolvimento de comportamentos naturais que lhes permitirão a sobrevivência em meio selvagem. A par disso, sendo uma espécie que apenas existe numa área geográfica muito limitada, os estudos e informação acerca da mesma são ainda escassos, pelo que todos os trabalhos que permitam conhecer um pouco melhor estes animais são da maior importância, quer a nível local, quer a nível global, onde quer que se encontrem outras populações de lince ibérico.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. INTRODUÇÃO

O lince ibérico (*Lynx pardinus*) é um felino de porte médio, pertencente ao género *Lynx*, no qual estão incluídas outras 3 espécies, o lince euroasiático (*Lynx linx*), o lince vermelho (*Lynx rufus*) e o lince canadense (*Lynx canadensis*) (Palomares, 2009). Considerada a mais ameaçada das 38 espécies de felinos, era a única classificada como *critically endangered* (CR) (Sunkist & Sunkist, 2014) até 23 de junho de 2015, data em que o seu estatuto de conservação foi alterado para *endangered* (EN) (Rodríguez & Calzada, 2015).

Segundo o mais recente censo da população, o número de lince em estado selvagem em toda a região da Península Ibérica é pouco superior a 400 indivíduos, dos quais 120 são fêmeas com território definido e 115 são crias (Mata, 2016).

O lince ibérico caracteriza-se por ter barbas compridas, pincéis escuros na ponta das orelhas, uma cauda curta que termina com uma mancha escura e membros altos com extremidades grandes. Existem diferenças de estatura entre machos e fêmeas, sendo que os machos têm em média 82 centímetros (cm) de comprimento (sem cauda), 46cm de altura da cernelha e pesam entre 12,5 quilogramas (kg) e 14,5kg, ao passo que as fêmeas medem, em média, respectivamente 76cm e 42cm com um peso que varia entre 9,5kg e 10,5kg. A pelagem do lince ibérico apresenta um padrão malhado que varia de indivíduo para indivíduo, podendo ser utilizada para a identificação individual de cada lince (*Grupo de manejo sanitario del lince ibérico* [GMSLI], 2014). Além das diferenças individuais, é possível identificar três variedades no que toca ao padrão da pelagem. Uma das variedades apresenta manchas maiores, que são normalmente acompanhadas de riscas longitudinais na zona do pescoço e que se observam tradicionalmente em animais com uma cor mais amarelada. Por oposição, existe uma variedade de pelagem onde as manchas pretas são mais pequenas, aparecendo na forma de pequenas pintas indistintas, observadas principalmente em animais com um pelo de tom mais acizentado. É considerada ainda a existência de um padrão de pelagem intermédio, onde apesar de as manchas serem pequenas são bem delimitadas. Apesar de a nível histórico ser possível identificar a presença de todos estes tipos de pelagem em todas as populações, é visível um predomínio do padrão com manchas grandes na população de *Doñana*, sendo o padrão de manchas pequenas mais associado à população de *Sierra Morena* (Palomares, 2009; Iberlince 2016). A alimentação do lince ibérico consiste quase exclusivamente de coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus*) (Nowell & Jackson, 1996; Palomares, 2009) sendo que este constitui entre 80 a 99% da biomassa consumida (GMSLI, 2014; Sunkist & Sunkist, 2014). Verificam-se ao longo do ano variações tanto na idade dos coelhos caçados como na sua proporção na dieta, sendo que crias e juvenis são mais caçados na primavera e verão que nas outras estações (Palomares, 2009), e que o consumo de coelho bravo diminui durante os meses de inverno, acompanhando as variações naturais da população (Nowell & Jackson, 1996). A

dependência do coelho bravo é tão marcada que não é possível encontrar populações estáveis de lince ibérico em zonas onde não exista uma população suficientemente grande de coelho para servir de base à sua alimentação (Palomares, 2009; GMSLI, 2014; Sunquist & Sunquist, 2014). Esporadicamente fazem também parte da alimentação do lince ibérico outras espécies de aves e mamíferos, entre as quais se encontram perdizes, pegas, pombos, patos, gansos, pequenos roedores, lebres, gamos e veados (Palomares, 2009).

## **2.2. CONSERVAÇÃO EX-SITU**

A Organização das Nações Unidas define, no Artigo 2 da Convenção sobre Diversidade Biológica, a conservação *ex-situ* como sendo a conservação de componentes de biodiversidade fora do seu *habitat* natural (Conferência das Nações Unidas sobre o Ambiente e Desenvolvimento, 1992). Para este efeito os animais ou plantas são recolhidos do meio selvagem e reproduzidos sob condições controladas em espaços como jardins, zoológicos ou centros de reprodução. A manutenção das espécies em ambiente de cativeiro tem as vantagens de lhes assegurar alimentação, abrigo e segurança, o que aumenta a sua esperança média de vida e duração de vida reprodutiva, possibilitando um aumento no número de descendentes (Satyanarayan, Zade, Sitre & Meshram, 2009).

A reprodução em cativeiro de uma população sustentável de uma determinada espécie é uma ferramenta importante para a conservação de muitas espécies. No caso das espécies animais este trabalho tem sido desenvolvido especialmente pelos zoológicos. Os avanços conseguidos na gestão das populações em cativeiro de diferentes espécies, mostraram que os zoológicos ajudam não só a prevenir o decréscimo no número de animais, mas contribuem também para a manutenção da diversidade genética da espécie (Mallinson, 1995). A gestão de populações de espécies animais em cativeiro foi melhorada após a intervenção de organizações internacionais de jardins zoológicos e aquários, que têm entre os seus principais objetivos a missão de facilitar a ligação entre jardins zoológicos em diferentes países e fomentar a criação de planos de sobrevivência das espécies, criando na prática uma única população da espécie que passa a ser gerida de uma forma global (*World Association of Zoos and Aquariums* [WAZA], 2005). Estes programas de reprodução em cativeiro com o objetivo de posteriormente proceder à libertação dos animais no ambiente selvagem têm sido uma parte integrante das ações de conservação de muitas espécies, e foram já responsáveis pela reintrodução de espécies que se encontravam extintas no seu estado selvagem, sendo disso exemplo o cavalo de przewalski (*Equus ferus przewalskii*), o condor da califórnia (*Gymnogyps californianus*) e o tórrido americano (*Mustela nigripes*) (Gusset & Dick, 2012).

## **2.3. PROJETO DE CONSERVAÇÃO DO LINCE IBÉRICO**

O declínio acentuado da população do lince ibérico registado na segunda metade do século XX a par do crescendo de preocupação com a sobrevivência da espécie levou a que no final da década de 1990 desse mesmo século se iniciassem em Portugal e Espanha projetos de

conservação para a sua proteção. No ano de 1990 o lince ibérico foi considerado em Espanha, por decreto real, como espécie ameaçada, o que obrigou as cinco comunidades autónomas onde se registava a presença de lince ibérico a tomar medidas de conservação para evitar a extinção da espécie. No entanto, só em 1999 é adotada uma estratégia nacional de conservação para o lince ibérico, com o propósito de conciliar os esforços de todos os departamentos governamentais relevantes para a recuperação da espécie (Calzada, González, Guzmán & Heredia, 2009). Em Portugal as medidas de conservação começaram em 1997, ao abrigo do programa LIFE, com projetos *in situ* direcionados maioritariamente para a zona da Serra da Malcata, uma das três zonas principais identificadas como áreas de potencial núcleo histórico da espécie (Sarmiento et al., 2009). Neste capítulo pretende-se dar um enquadramento histórico da evolução dos projetos desenvolvidos para a conservação do lince ibérico, tanto em Espanha como em Portugal.

### **2.3.1. PROJETO DE CONSERVAÇÃO EM ESPANHA**

A estratégia de conservação adotada pelo governo espanhol em 1999 foi desenhada para se prolongar indefinidamente, no entanto ficou acordado que deveria ser feita uma revisão anual da mesma e, se necessário, uma atualização a cada quatro anos. Apesar de em 2003 não ter sido considerado necessário fazer alterações ao documento, em 2007, à luz dos novos dados disponíveis, do arranque de novos projetos LIFE e do início do projeto de conservação *ex situ*, foram necessárias alterações que levaram à elaboração de uma nova estratégia para a conservação do lince ibérico. Nesta estratégia ficou patente a ideia de que, devido às necessidades respeitantes ao *habitat* da espécie, a recuperação do lince ibérico seria inatingível se fosse realizada apenas numa parte do território, reforçando a necessidade de intervenção de estruturas governamentais que permitissem uma gestão mais abrangente. Para a recuperação do lince ibérico, a estratégia de conservação implementada em Espanha previa três passos indispensáveis, sendo que o primeiro desses passos era a estabilização das populações existentes. Para esse efeito era necessário que fossem identificadas e mitigadas as ameaças à espécie responsáveis pelo seu declínio. Este controlo sobre as ameaças ao lince ibérico deveria ser adotado e adaptado pelos governos autónomos de cada comunidade, acompanhado da criação de objetivos realísticos e mensuráveis e com datas limite para o cumprimento dos mesmos. Era também importante a criação de meios de verificação desses objetivos que permitissem identificar e distinguir falhas na estratégia estipulada de situações de incumprimento (Calzada et al., 2009).

Na Andaluzia, região do sul de Espanha onde se encontram as duas populações da espécie, as causas de morte identificadas eram maioritariamente antropogénicas, entre as mais comuns contavam-se a caça ilegal, o atropelamento e o afogamento em poços, já no âmbito das mortes naturais sobressaíam as doenças infecciosas como as principais causas de morte. Para minorar estas ameaças foram tomadas várias medidas, entre as quais, o aumento da vigilância e controlo sobre a caça ilegal, a criação de passagens por baixo de

estradas/auto-estradas, instalação de sinalização indicadora da presença de lince, cobertura dos poços com vedações, sendo necessário que estas medidas fossem acompanhadas de uma sensibilização e informação das pessoas, em especial das que habitavam a região onde foram implementadas. Para a situação das doenças infecciosas o seu controlo passou pela implementação de um sistema de vigilância epidemiológica (Simón et al., 2009).

Outro importante alicerce da estabilização das populações existentes na Andaluzia era a preservação e melhoramento do *habitat* natural do lince, o que incluía a manutenção de uma população estável de coelho bravo. As ações sobre o *habitat* foram direcionadas para a preservação do matagal mediterrânico e criação de refúgios artificiais para o coelho. Outras medidas, como a redução da pressão de caça e a introdução de coelhos vindos de cativeiro foram por vezes necessárias em áreas críticas, onde a população de coelho não chegou ao limiar de um coelho por hectare durante os meses de outono, valor considerado o mínimo indispensável para a sobrevivência do lince (Calzada et al., 2009).

O segundo e terceiro passos da estratégia de conservação espanhola do lince ibérico eram respetivamente aumentar o número de indivíduos nas populações existentes e o número total de populações por forma a inverter o declínio da espécie. O aumento destes números era especialmente importante pois o risco de extinção é inversamente relacionado com o valor dos mesmos, e com apenas duas populações, ambas de pequenas dimensões o lince ibérico correria um grande risco na eventualidade de uma catástrofe natural ou epidemia. Os objetivos traçados para o número de indivíduos nas duas populações existentes eram que pelo menos uma delas atingisse um mínimo de cinquenta adultos reprodutores, sendo que nenhuma delas deveria ter mais de 90% do total de adultos reprodutores. Estes valores foram determinados baseados nos critérios da *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) com o intuito de elevar o estatuto de conservação do lince de CR para EN até ao ano de 2011. Como objetivos para o terceiro e último passo desta estratégia de conservação encontrava-se o estabelecimento de pelo menos uma população sustentável em cada uma das cinco comunidades autónomas onde em 1990 se registava ocorrências de lince ibérico. Neste objetivo, juntava-se a estas comunidades a intenção de criar uma população sustentável de lince ibérico em território português. Estas novas populações deveriam conseguir atingir, até 2020, um número mínimo de 250 adultos reprodutores, o que a par da ausência de sinais de declínio levaria o lince a atingir o estatuto de *vulnerable* (VU). Para que isso pudesse ser tornado realidade seria necessária a criação de zonas propícias à sobrevivência do lince, com condições semelhantes às necessárias para o primeiro passo das populações existentes. Para o cumprimento destes objetivos um dos principais meios necessários era a reprodução em cativeiro para auxiliar o crescimento das populações selvagens através de reintroduções. Assim foi também incluído na estratégia nacional de conservação o programa de conservação *ex situ* do lince ibérico, este

não só permitiria a reprodução de animais destinados à reintrodução, como criaria uma salvaguarda contra ocorrências naturais catastróficas. Assim foi programada a construção de dois novos centros de reprodução, em Castilla-La Mancha e Extremadura, que juntando-se aos dois já existentes na Andaluzia, formariam um total de quatro centros em Espanha. Portugal aliou-se a este esforço e procedeu também à construção de um centro de reprodução que se localiza no concelho de Silves (Calzada et al., 2009).

### **2.3.2. PROJETO DE CONSERVAÇÃO EM PORTUGAL**

Em Portugal o declínio da população de lince ibérico foi tão acentuado que em meados da década de 1970 o primeiro estudo científico a incidir sobre a população portuguesa da espécie estimou a existência de um total de cinquenta indivíduos distribuídos por três zonas distintas, Algarve, Vale do Sado e Serra da Malcata. Mais tarde entre 1994 e 1997 um novo estudo, desta vez baseado em inquéritos e entrevistas à população local, estimou a existência de quarenta a cinquenta e três lince distribuídos por cinco populações. No entanto, no início da primeira década do século XXI, um estudo da população, conduzido em conjunto entre Portugal e Espanha, levando apenas em consideração métodos que permitissem a identificação inequívoca da presença de lince revelou a não existência de indícios da espécie em Portugal. Não sendo possível confirmar a extinção do lince em Portugal, o facto de a última presença confirmada da espécie serem fezes colhidas em 2001 na zona de Moura-Barrancos deixou a descoberto uma situação muito preocupante (Sarmiento et al., 2009).

Deste modo, em Portugal, as ações de conservação do lince ibérico foram maioritariamente direcionadas à recuperação do seu *habitat* natural em território nacional, por forma poder permitir eventuais projetos de reintrodução. As ações *in situ* iniciaram-se em 1997 com especial foco na zona da Malcata, onde as medidas tomadas visaram a recuperação da população de coelho bravo na região, através da criação de abrigos e zonas de pasto conciliadas com a introdução de alguns animais para aumentar a população (Sarmiento et al., 2009). Mais tarde, já em 2005 foi elaborado o plano de conservação *ex situ* para o lince-ibérico em Portugal, este documento vem no seguimento do assumir por parte do governo português de um compromisso de participação no programa de reprodução em cativeiro do lince-ibérico. Os principais objectivos deste plano eram a reprodução de exemplares de lince-ibérico adequados ao reforço de populações existentes da espécie ou à criação de novas populações dentro da sua distribuição histórica, gerindo a população de cativeiro por forma a garantir que num período de 30 anos fosse conservada pelo menos 85 por cento (%) da variabilidade genética existente na natureza. Para o cumprimento destes objectivos era da maior importância a manutenção de um programa de reprodução unificado entre Portugal e Espanha, com uma direção executiva única responsável pela gestão do mesmo, apoiada por um comité de criação multidisciplinar. Nos objectivos do plano de conservação *ex situ* para o lince-ibérico em Portugal encontrava-se ainda a criação de novos centros de

reprodução (Serra, Sarmento, Baeta, Simão & Abreu, 2005). No decorrer do ano 2006, a Liga de Proteção da Natureza (LPN) em associação com a *Fauna & Flora International* (FFI) iniciou um novo projeto de conservação de *habitat* do lince, desta vez na zona de Moura-Barrancos que se encontra ao abrigo da rede Natura 2000, cujo objetivo era aumentar a sustentabilidade do ecossistema através de acordos com os proprietários de terrenos e reservas de caça, tentando garantir uma exploração regrada dos recursos cinegéticos compatível com a sobrevivência do lince na região (Sarmento et al., 2009).

No decorrer do ano 2008 foi aprovado plano de ação para a conservação do lince ibérico desenvolvido pelo Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) com o objetivo de criar condições para a reintrodução da espécie em todas as zonas da sua distribuição histórica incluídas dentro da rede Natura 2000. O plano envolvia medidas *in situ* a diferentes níveis que visavam sobretudo a preservação do *habitat* e a sustentabilidade das populações de coelho bravo nas zonas abrangidas. A um nível mais local as medidas a aplicar eram entre outras, a criação de programas de controlo de animais errantes, recuperação de áreas de matagal mediterrânico, a promoção da plantação de culturas de cereais, de uma caça ao coelho bravo sustentável, o aumento do controlo sobre a caça ilegal e a eventual introdução de coelhos para aumento de população. O plano previu também a identificação e preservação de potenciais corredores ecológicos entre as diferentes áreas de distribuição histórica do lince por forma a permitir as deslocações e movimentos de dispersão que garantem a troca genética entre as populações. Nestes corredores, o plano de ação definiu regras semelhantes às que foram definidas para as áreas de população, entre as quais, que o matagal mediterrânico deveria ser preservado e a caça ao coelho deveria ser gerida de forma sustentável (Sarmento et al., 2009).

Em 2009, como ação compensatória pela construção de uma barragem em Odelouca, zona da rede Natura 2000 e região de presença histórica do lince ibérico, foram tomadas várias medidas locais de proteção e recuperação do ecossistema Mediterrânico. No entanto a mais notável das contrapartidas da construção desta barragem foi a construção e inauguração do Centro Nacional de Reprodução do Lince Ibérico no concelho de Silves. Este centro foi desenhado para permitir a permanência de dezasseis lince reprodutores provenientes dos outros centros integrantes do programa de reprodução em cativeiro (Sarmento et al., 2009).

A 1 de Julho de 2014 celebrou-se em Portugal a assinatura do Pacto Nacional para a Conservação do Lince Ibérico (Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e Energia [MAOTE], 2014). Neste pacto o governo português assumiu a importância da sociedade e do envolvimento desta, seja de forma individual ou coletiva, na conservação do lince. Este pacto foi aberto à população para que qualquer pessoa pudesse participar neste esforço de preservação da espécie, nele os assinantes comprometem-se a respeitar os objetivos e princípios do pacto e a participar de forma ativa na conservação quer na forma de aplicação de medidas concretas na sua propriedade, quer através da consciencialização da restante

população. Em contrapartida, neste pacto o governo assegura, entre outras coisas, que a presença do lince não trará quaisquer limitações na utilização dos terrenos e a indemnização de eventuais mortes de animais causadas por exemplares de lince ibérico (ICNF, 2014).

#### **2.4. PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO *EX SITU* DO LINCE IBÉRICO**

O programa de conservação *ex situ* do lince ibérico foi iniciado em Espanha como parte integrante da estratégia nacional para a preservação da espécie. No entanto, a sua implementação passou a ser fruto da colaboração entre o governo espanhol, o governo da região autónoma de Andaluzia e o governo português. Este programa foi criado com dois objetivos principais, a manutenção de uma população em cativeiro gerida tanto genética como demograficamente que sirva como salvaguarda contra a extinção imediata e estabelecimento de populações de vida livre sustentáveis através de reintroduções de animais nascidos e criados em cativeiro. Para alcançar estes objetivos o programa de conservação *ex situ* apoiou-se numa abordagem multidisciplinar que pode ser dividida pelas seguintes seis grandes áreas: manejo genético e demográfico, comportamento e reprodução em cativeiro, fisiologia reprodutiva, reintrodução, sensibilização e educação e manejo sanitário e outros cuidados médico-veterinários (Vargas et al., 2009).

O papel que estas diferentes áreas desempenham no programa de conservação do lince ibérico é abordado em maior detalhe no seguimento deste capítulo (com exceção do manejo sanitário e outros cuidados médico-veterinários que se encontram incluídos nos capítulos consequentes).

##### **2.4.1. MANEIO GENÉTICO E DEMOGRÁFICO**

O manejo genético de um programa de reprodução em cativeiro para uma espécie com o objetivo da sua reintrodução na natureza é uma tarefa dispendiosa e complexa, que tem como ponto fulcral a manutenção da maior variabilidade genética possível. No entanto, as populações em cativeiro são muitas vezes de reduzidas dimensões e os indivíduos não dispõem da capacidade de deslocação que em meio selvagem permite a troca genética entre diferentes populações. Isto leva muitas vezes a situações de endogamia que causam perdas na diversidade genética que podem por em risco o sucesso dos programas de reprodução *ex situ*. Estas situações podem ser minimizadas através de um planeamento criterioso em todas as fases do programa, que começa na seleção dos fundadores, passa pela gestão dos pares reprodutores e termina com a escolha dos animais a reintroduzir e do local ideal para cada reintrodução em particular (Leus & Lacy, 2009).

No caso do programa de reprodução do lince ibérico, devido à natureza da população selvagem (que consiste em duas distintas populações menores), a primeira questão que se colocou foi se a população deveria ser considerada como um todo ou se cada população deveria ser gerida individualmente. Para tomar esta decisão é importante perceber se eventuais diferenças genéticas entra as populações são derivadas de um processo de



seleção natural que resultou em benefícios para a sobrevivência da população ou se são pelo contrário causadas por fenómenos de deriva genética. Através de uma análise histórica da demografia da espécie e do seu declínio é possível perceber que a população existente em *Doñana* terá ficado isolada da restante população da espécie há mais de cinquenta anos, ao passo que a população de *Sierra Morena* terá mantido o contato com outras populações até um período mais recente em que a diminuição da população a isolou. Assim será de esperar que quaisquer diferenças genéticas encontradas entre as populações se devam à deriva genética causada pela endogamia inerente a populações diminutas. Esta hipótese é coerente com os resultados das análises genéticas feitas a ambas as populações, que revelaram também a reduzida variabilidade genética existente no conjunto das duas populações. Desse modo a abordagem mais segura para a preservação da diversidade genética é a de considerar as duas populações como um todo e proceder à sua gestão como tal (Godoy, Casas-Marce & Fernández, 2009).

O passo seguinte é o de escolher os fundadores, estes devem representar o melhor possível a totalidade da variabilidade genética da população, para isso devem ser no maior número e com o menor grau de parentesco possíveis. Porém, isso pode ser problemático quando se aborda uma espécie tão ameaçada como o lince ibérico, pois a recolha de demasiados animais pode por em causa a sobrevivência da população selvagem de origem. Exatamente por esta razão, as diretrizes da IUCN recomendam que um programa de reprodução *ex situ* seja iniciado quando a espécie ainda possui um número total de exemplares em estado selvagem na casa dos milhares (Leus & Lacy, 2009). Não tendo sido isto possível no caso do lince ibérico e tendo em conta que vinte a trinta animais, se escolhidos aleatoriamente, representam estatisticamente 97,5% a 98,3% da variabilidade genética total da população, foram utilizados com potenciais fundadores vinte-e-oito animais. Por forma a maximizar a variabilidade genética foi determinado que a proporção nos fundadores deveria ser 64% com proveniência de *Sierra Morena* e 36% de *Doñana*, no entanto dos potenciais fundadores vinte-e-quatro eram originários da população de *Sierra Morena* e apenas quatro de *Doñana*, isto levou a que fossem introduzidos dois novos animais provenientes desta última população (Godoy et al., 2009).

Após estabelecer uma população de fundadores é necessário considerar que a diversidade genética tende a perde-se gradualmente a cada geração pois é estatisticamente muito difícil que um progenitor passe a totalidade da sua informação genética à descendência. Em teoria para que uma população de cativeiro consiga manter o mesmo grau de variabilidade genética seria necessária uma população entre os 1 700 e 17 000 indivíduos. Uma vez que na grande maioria das situações isto é impraticável, é comumente aceite pela comunidade internacional de zoológicos e aquários, uma perda de variabilidade que mantenha 90% da variabilidade ao fim de 100 anos, sendo que para cumprir esta meta são apenas necessárias algumas centenas de animais. No programa do lince, no entanto, mesmo esta

situação seria inoportuna, pois a população selvagem não seria capaz de suportar a perda de 12 fundadores por ano durante cinco anos que seria necessário adicionar e o programa não dispõe de recursos para alojar os 500 reprodutores previstos para atingir essa meta. Foi por isso delineado um plano mais coerente com os recursos disponíveis e com a capacidade da população selvagem. Neste, o objetivo definido foi o de manter 85% da variabilidade ao fim de 30 anos, sendo que para tal a população cativa seria de 60 reprodutores e a recolha de animais da natureza de apenas 4 por ano durante cinco anos com 1 adicional a cada dois anos durante toda a duração do programa (Leus & Lacy, 2009). Para suportar estes 60 animais foi, no entanto, necessário construir mais centros de reprodução, desse modo encontram-se atualmente em funcionamento um total de cinco centros de cria com uma capacidade de alojamento que varia entre os 5 e os 23 reprodutores (Programa de Conservación Ex-situ del Lince Ibérico [PCELI], 2015).

A fase seguinte na gestão é a seleção dos casais reprodutores que tem de ser feita de forma a minimizar a perda genética. Devido à reduzida dimensão da população original de onde foram retirados os lince, seria incauto não considerar que exista algum grau de consanguinidade entre eles, assim o planeamento dos cruzamentos deve ser feito após uma análise genética que faça uma estimativa do grau de parentesco, sendo que devem favorecer-se a formação de casais entre animais o menos aparentados possível. Existem no entanto limitações biológicas que tornam o processo de seleção de casais mais complexo, a prolificidade varia entre casais levando a maior representação de determinados fundadores, o número ideal de descendentes para um determinado reprodutor mais valioso do ponto de vista genético pode também ser de tal forma grande que supera os limites naturais da prolificidade dos animais, e existem também casos de incompatibilidade comportamental. Por todas estas razões o planeamento reprodutivo do programa *ex situ* tem de ser flexível e adaptável para acomodar estas situações. A solução de muitas destas situações pode passar pela aplicação de tecnologias reprodutivas mas estas, apesar de estarem a ser desenvolvidas, não se encontram disponíveis para aplicação rotineira no programa (Godoy et al., 2009) No entanto, os esforços neste sentido são uma constante do programa, estando para breve o início da aplicação de técnicas de inseminação artificial (R. Serra, comunicação pessoal, Setembro 20, 2016).

Após se atingir o número desejável de reprodutores na população de cativo, passa a ser aconselhável o início das libertações no meio selvagem de animais nascidos em cativo. Do ponto de vista genético, os animais a reintroduzir devem preferencialmente estar entre os mais representados geneticamente na população de cativo e simultaneamente os menos representados na população de destino, para que a sua saída do programa tenha o menor impacto em termos de perda de variabilidade genética em cativo e o maior benefício para a população selvagem (Leus & Lacy, 2009). Com o avançar do programa e das libertações deverá passar a gerir-se a população de cativo em conjunto com a

população selvagem introduzindo periodicamente novos animais provenientes de estado selvagem na população de cativeiro e limitando a reprodução de indivíduos com uma genética já muito representada (Godoy et al., 2009).

#### **2.4.2. COMPORTAMENTO E REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO**

Para o sucesso da cria em cativeiro do lince ibérico é fundamental abordar o seu bem-estar de uma perspectiva multidisciplinar e o mais abrangente possível, sendo fundamental encontrar um equilíbrio entre um ambiente que estimule os comportamentos naturais e um ambiente livre de *stress* propício à reprodução (Vargas et al., 2009).

Para garantir esse tipo de ambiente é essencial a aplicação de medidas de enriquecimento ambiental, tendo este, no caso do lince ibérico, a dupla função de estimular os comportamentos naturais da espécie e prevenir o aparecimento de condutas repetitivas. Este pode apresentar-se de várias formas, entre as quais o fornecimento de presa viva, introdução de plantas aromáticas, urina ou fezes de outro lince no cercado, colocação e alteração da posição de elementos como plataformas, troncos, etc. ou, em casos particulares de dois lince com comportamento compatível, permitir o contato direto entre eles (Vargas et al., 2005). No que diz respeito ao fornecimento de presa viva, caso a presa seja coelho, o benefício proveniente dessa forma de enriquecimento pode ser aumentado se existirem no cercado abrigos onde os estes se possam esconder (Vargas et al., 2005). Este benefício provém do aumento na dificuldade de capturar o coelho, o que leva a um maior dispêndio de tempo por parte dos lince nas atividades de caça, desse modo estruturas mais complexas que simulem melhor o ambiente natural trazem maior benefício em termos de enriquecimento ambiental para os lince (Requeijão, 2013). A par do benefício direto a nível comportamental, é espectável que a presença de elementos de enriquecimento ambiental nas instalações melhore indiretamente a performance reprodutiva dos lince, à semelhança do que é observado noutras espécies de felinos em cativeiro, aumentando com isso as possibilidades de sucesso do programa (Gallardo, 2007).

No programa de reprodução em cativeiro, uma das ferramentas centrais é o sistema de videovigilância. Este sistema permite uma observação em tempo real de todos os cercados o que possibilita a intervenção atempada em casos de interações negativas entre animais, a observação de toda a diversidade de comportamentos sexuais ao longo da época reprodutiva, desde os primeiros sinais de cio, cópulas, início dos comportamentos maternos, primeiros sinais de parto e o seu desenrolar, assim como todo o desenvolvimento das crias. É também uma ferramenta fundamental no manejo diário do centro permitindo um acompanhamento cuidado das intervenções dos tratadores nas instalações dos animais. A par desta vigilância permanente, o sistema de vídeo permite o registo de dados comportamentais que são depois analisados e que permitem aumentar o conhecimento que temos sobre o comportamento destes felinos em cativeiro e o sucesso do programa de reprodução (Vargas et al., 2005). O conhecimento adquirido mediante este sistema é notório

sobretudo no início de vida das crias e do seu desenvolvimento até ao desmame, sendo que esta fase é muito difícil de observar em meio selvagem (Vargas et al., 2009).

Outra parte importante do manejo em cativeiro é a alimentação, que por motivos nutricionais e comportamentais deve assemelhar-se o mais possível à que os lince teriam em vida livre, sendo maioritariamente constituída por coelho na forma de presa viva. Para além do coelho vivo, a alimentação inclui também coelho morto, complementada com carne de aves ou ungulados uma vez por semana. O alimento é distribuído uma vez por dia, existindo um dia semanal de jejum, que visa recriar em parte a falta de recursos alimentares com que os animais se podem deparar no meio selvagem e que serve também como medida de prevenção para a obesidade (Shoemaker, Maruska & Rockwell, 1997). Em situações específicas como a gestação ou lactação das fêmeas, onde as necessidades nutricionais se encontram aumentadas, não se põe em prática o dia de jejum, sendo estas alimentadas todos os dias sem interrupção (Vargas et al., 2006). No caso das crias destinadas a serem reintroduzidas é recomendável que todo o alimento seja disponibilizado na forma de presa viva para permitir o desenvolvimento dos comportamentos de predação essenciais para a sobrevivência em meio selvagem (Gallardo, 2007). É também aconselhável evitar ao máximo que as crias destinadas a reintrodução façam a associação entre a presença humana e a distribuição de alimento. Sendo que para a diminuição desta, a comida deve ser distribuída a uma hora aleatória em vez de durante o período normal de manejo diário (Alves, 2014).

Devido à natureza sazonal do ciclo reprodutivo do lince ibérico, o manejo destes animais em cativeiro deve também ser programado e adaptado em função deste ciclo. Sendo que o estro das fêmeas se inicia normalmente no fim do mês de Dezembro, é importante que toda a manutenção necessária às instalações seja feita antes dessa altura para que durante a época reprodutiva a presença humana junto dos animais seja a menor possível. Da mesma forma os exames reprodutivos de rotina a machos e fêmeas devem ser realizados com antecedência, normalmente durante o mês de Novembro, para rastreio de potenciais problemas antes de se iniciar o planeamento dos casais de reprodutores para a época (Vargas et al., 2006).

Numa primeira fase, antes do início do estro da fêmea, é importante testar a compatibilidade comportamental entre macho e fêmea, para isso eles são colocados em instalações adjacentes, entre as quais existe um corredor à qual os lince têm acesso alternado, permitindo um contacto direto através de uma vedação. Durante esta fase todas as interações são registadas e caso predominem as interações positivas entre o casal é possível passar à fase de união. Para esta ocorrer é importante que a equipa do centro esteja preparada a intervir caso seja necessário, a guilhotina que separa os cercados é então aberta e o comportamento de macho e fêmea é observado em permanência e gravado em vídeo (Vargas et al., 2006). Com o aproximar da altura do cio ambos os

elementos do casal aumentam progressivamente a frequência das marcações e das vocalizações. No momento do cio a fêmea torna-se recetiva ao macho e este mantém uma vigilância constante mantendo-se sempre por perto. As cópulas são de curta duração e elevada frequência, prolongando-se ao longo de cerca de dois dias. Após este período a fêmea deixa de estar recetiva e o macho perde o interesse na fêmea. Por norma, mantém-se o macho e a fêmea no mesmo cercado desde o momento da união até que falem duas ou três semanas para a data estimada do parto (Vargas et al., 2006). Durante a gestação o maneo junto às fêmeas é reduzido ao mínimo para que as fêmeas se sintam tranquilas no cercado e especialmente na zona onde fizerem o ninho. Sensivelmente a partir de meio da gestação as fêmeas gestantes deixam de fazer o dia de jejum semanal e mais tarde passam a regime de alimentação *ad libitum* (Vargas et al., 2006). Durante a gestação é importante tentar que não existam nos cercados das fêmeas locais sem visibilidade via vídeo onde estas possam fazer o ninho, pois a visibilidade durante o parto é uma ferramenta chave para determinar a necessidade e o momento de intervir (Vargas et al., 2005). Nos dias que antecedem a data prevista do parto a videovigilância sobre a fêmea torna-se constante para que se possam identificar instantaneamente os primeiros sinais de parto. Após o início, o parto é então observado de perto e avaliado procurando detetar quaisquer eventuais problemas. É importante que nos dias que antecedem o primeiro parto da época as instalações de cria artificial tenham sido verificadas e preparadas para o caso de uma emergência em que sejam necessárias (Vargas et al., 2006). Nos três dias que se seguem a cada parto as entradas na zona dos cercados devem limitar-se à distribuição de comida, sendo que desde o início do primeiro parto até às quatro semanas após o último todas as atividades junto às fêmeas devam ser mantidas ao mínimo. Idealmente o maneo das crias destinadas a reintrodução é reduzido aos exames médico-veterinários essenciais, ficando estas com a mãe até poderem ser separadas, altura em que a progenitora fica sozinha até o início de uma nova época reprodutiva (Vargas et al., 2006). No entanto existem situações, tais como o canibalismo materno, abandono ou problemas de saúde, em que a vida de uma ou mais crias corra risco, sendo necessário separá-las da mãe (Vargas et al., 2006) e em caso de emergência recorrer à cria artificial (Vargas et al., 2005).

No período de desenvolvimento das crias existe um outro momento crítico correspondente a uma particularidade comportamental do lince ibérico, as lutas entre crias da ninhada. Estas lutas podem ser muito violentas e levar mesmo à morte de uma das crias envolvidas. Este tipo de comportamento agressivo com presença de elementos ritualizados é normalmente observado em aves e muito raramente em mamíferos. No entanto é um comportamento recorrente em ninhadas de lince ibérico e de lince euroasiático (Antonevich et al., 2009).

As lutas dão-se maioritariamente entre a 6ª e a 8ª semanas de vida, sendo que o período de agressividade se mantém normalmente durante as duas semanas que se seguem. Estas lutas parecem acontecer independentemente do sexo das crias e sem serem resultado de

competição por recursos. As mães respondem às lutas com a tentativa de separação das crias envolvidas, no entanto os seus esforços podem resultar na morte da cria. A gestão humana destas lutas é uma tarefa delicada, e a pura separação das crias leva normalmente a um aumento do período de agressividade (Antonevich et al., 2009).

#### **2.4.3. CRIA ARTIFICIAL**

A cria artificial é um método de manejo que deve ser aplicado apenas como último recurso, pois normalmente a mãe consegue oferecer à cria todos os cuidados que esta necessita de uma forma muito mais completa que quando criados pela mão humana. No entanto, ao trabalhar com uma espécie como o lince ibérico em que a sobrevivência de cada indivíduo é da maior importância a cria artificial apresenta-se como uma ferramenta indispensável para o programa (*Grupo Asesor de Aspectos Sanitarios del Lince Ibérico* [GAASLI], 2004).

Nos casos em que é necessário recorrer à cria artificial existem vários pontos essenciais a ter em conta para melhorar a probabilidade de sobrevivência e de desenvolvimento correto das crias. Um desses pontos é que deve evitar-se a cria artificial de um lince sozinho, sendo aconselhável juntar duas ou mais crias que precisem de cuidados humanos desde que não existam incompatibilidade de idades (GAASLI, 2004). Caso não seja possível juntá-lo a outra cria da mesma espécie, as crias de lince podem, a partir das quatro semanas de idade, ser criadas na companhia de crias de outra espécie dentro do género *Lynx* ou outros pequenos felinos como gatos domésticos, desde que estes tenham sido sujeitos a exame médico para garantir a ausência de doenças infecciosas (Rivas et al., 2009). Os cuidados de higiene em todas as fases do manejo das crias devem ser o mais rigorosos possível (GAASLI, 2004), especialmente se não tiveram hipótese de ingerir o colostro da mãe (Rivas et al., 2009). Alterações no manejo e alimentação devem ser introduzidas de forma gradual e em todas estas fases é aconselhável que participem não mais de três pessoas para garantir uma maior homogeneidade nos cuidados prestados. Sempre que possível, assim que a cria esteja fora de perigo de vida, deverá ser novamente entregue à mãe para que esta cuide dela o resto do tempo (GAASLI, 2004).

Ao nascimento as crias de lince não são capazes de regular a sua temperatura corporal, por isso é importante que sejam mantidas num ambiente com humidade de perto dos 50% e aquecido a uma temperatura entre os 30-32 graus Celsius (°C) durante a primeira semana, sendo que a temperatura ambiente deve ser diminuída a um ritmo de 3°C por semana até à 6ª semana a partir da qual se deverá manter perto dos 21°C. Além da temperatura é importante controlar a hidratação e o estado de nutrição. Uma vez que a taxa de crescimento espelha a saúde da cria é importante pesá-la antes e depois de cada refeição para acompanhar a evolução do seu peso, pois nesta fase qualquer perda de peso que se aproxime dos 10% do peso corporal pode pôr em risco a sobrevivência da cria (Rivas et al., 2009). Antes de iniciar a alimentação de uma cria de lince é importante estimular a micção e a defecação da cria, esfregando suavemente a zona genital e perianal com uma gaze

húmida. A frequência e composição da alimentação devem variar com o tempo mimetizando o que aconteceria caso fossem alimentados pela progenitora. Em caso de a cria não ter ingerido o colostro da mãe, deverá ser-lhe administrado colostro artificial ou soro de lince para que a cria possa adquirir algum grau de imunidade passiva (Rivas et al., 2009).

Por volta das cinco a seis semanas de vida, altura em que os caninos e incisivos já estão presentes e os pré-molares começam a aparecer, pode iniciar-se o desmame. Durante algum tempo, normalmente entre os 61 e 104 dias de vida, a cria tolera tanto leite como alimentos sólidos, devendo ser feita nesta fase uma substituição progressiva do leite para os sólidos. A partir do ponto em que a cria esteja a alimentar-se apenas de sólidos é importante que tenha sempre disponível um recipiente com água para beber (Rivas et al., 2009).

Ao iniciar-se a cria artificial de um lince ibérico é importante definir-se à partida quais são os objetivos a alcançar com esse indivíduo, pois o contacto humano inerente a essa situação é predisponente para o aparecimento de comportamentos anómalos à espécie e que serão depois dificilmente alteráveis. Deste modo, não é aconselhada a reintrodução em meio selvagem de animais que tenham sido criados por meio de cria artificial. Para permitir o desenvolvimento de comportamentos naturais é importante que a cria de lince ibérico seja submetida a um programa de socialização incorporado no processo de cria artificial. Para a correta socialização da cria, ela deve ter contacto com outros lince da mesma espécie, ou caso não seja possível com outros felinos de pequeno porte, isto é importante pois espécimes criados sem estas condições podem desenvolver-se em adultos que ao atingirem a maturidade sexual não mostrem interesse reprodutivo para com outros membros da mesma espécie. Para esta socialização considera-se como sendo o período mais importante aquele que se compreende entre as duas e as vinte semanas de vida, período durante o qual a cria estaria ainda dependente da mãe. Se for garantida a correta socialização das crias, a presença humana durante esse período parece já não afetar negativamente o desempenho reprodutivo. No entanto, animais criados sob esse contacto próximo com humanos podem crescer para se tornar adultos sem medo da presença humana, o que pode originar problemas de manejo no futuro (Rivas et al., 2009).

#### **2.4.4. FISILOGIA REPRODUTIVA**

Num programa de reprodução *ex situ* como o do lince ibérico, o conhecimento da fisiologia reprodutiva da espécie e o desenvolvimento de tecnologias que permitam aumentar o sucesso reprodutivo da espécie são da maior importância (Wildt, Howard, Pelican, Brown & Pukazhenth, 2009). Estas tecnologias são usadas essencialmente para aumentar o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva específica do lince ibérico, ajudar na manutenção da maior variabilidade genética possível e verificar a aptidão reprodutiva dos adultos que integram o programa (Vargas, 2009).

A diversidade da fisiologia reprodutiva dentro das diferentes espécies de felinos é tanta que se torna impossível usar apenas uma delas como modelo para as restantes, isso realça a

importância de conhecer intimamente a fisiologia reprodutiva do lince ibérico por forma a evitar extrapolações que podem não ser corretas (Wildt et al., 2009). Os machos parecem não apresentar grande sazonalidade, não existindo diferenças significativas de parâmetros reprodutivos como tamanho testicular e qualidade do sémen entre exames feitos antes e depois da época reprodutiva. Quando comparados com os valores obtidos noutras espécies de felinos com o mesmo porte, tanto o tamanho testicular como a qualidade do sémen revelam valores inferiores no caso do lince ibérico, no entanto são bastante similares aos observados no lince euroasiático e no lince vermelho. Verificou-se também uma elevada prevalência de machos com teratospermia nas populações de lince ibérico sendo que esta situação pode estar ligada à reduzida variabilidade genética presente na espécie. Não foram encontradas diferenças significativas na qualidade espermática e no tamanho testicular entre machos em cativeiro e machos de vida livre. Tendo em conta as diferenças encontradas nesses mesmos parâmetros entre machos de diferentes idades é possível determinar que os machos de lince ibérico atingem a sua maturidade sexual aos quatro anos de idade (Gañan, et al., 2010).

As fêmeas são marcadamente sazonais, com aumentos dos níveis de estrogénio durante a época reprodutiva, com a presença de picos após as cópulas, no entanto os maiores picos nos níveis desta hormona registam-se nas semanas após o parto. Outro dado curioso resultante das análises de hormonas presentes nas fezes é a persistência de níveis elevados de progesterona até muito depois do parto (Pelican et al., 2009). A presença de progesterona após o parto explica-se pela presença de corpos lúteos que não regredem antes do início de uma nova época reprodutiva. Isto traduz-se na presença de corpos lúteos ao longo de todo o ano. Esta característica do lince ibérico verifica-se em todos os elementos do género *Lynx* mas é díspar do que se conhece para as outras espécies de felinos. Entre outras implicações, este constante nível de progesterona torna impossível o diagnóstico de gestação através da sua medição nas fezes (Göritz et al., 2009).

O período de gestação do lince ibérico é de cerca de 64 dias (Rivas et al., 2009) e, tendo em conta a sazonalidade reprodutiva das fêmeas, a capacidade de determinar atempadamente se um fêmea se encontra ou não gestante torna-se uma ferramenta importante para o manejo da população de cativeiro (Braun et al., 2009). Nesse sentido e tendo em conta a impossibilidade de diagnosticar a gestação através da medição dos níveis de progesterona, têm sido desenvolvidos novos testes que possibilitem essa tarefa. Uma das alternativas que se apresentou foi a medição de relaxina na urina. Esta hormona era já conhecida por ser detetável na urina e por ser maioritariamente produzida pela placenta no caso do gato doméstico (*Felis catus*) (Braun et al., 2009). Assim, Braun et al. (2009) desenvolveu um estudo com o objetivo de testar a possibilidade da utilização desta hormona no caso do lince ibérico. Os resultados deste estudo mostraram que à semelhança do que acontece no gato é possível ligar o aumento dos níveis de relaxina com a presença de uma gestação. No



estudo foram utilizados testes *Witness*<sup>®</sup> para a detecção da relaxina, porém no caso do lince só foi possível fazer esta detecção com recurso a urina concentrada e numa fase tardia da gestação (entre os dias 37 e 42). Análises feitas com urina fresca, congelada ou colhida antes do dia 37 após a primeira cópula observada, apresentaram resultados negativos no teste, além disso em duas das quinze amostras o teste deu também resultado negativo para fêmeas gestantes cuja urina tinha sido colhida entre dia 37 e 42. O estudo conclui assim que a presença de relaxina na urina é um sinal positivo de gestação mas resultados negativos no teste podem muitas vezes ser falsos negativos, deixando a recomendação para o desenvolvimento de testes com maior sensibilidade. Ainda neste estudo foi aplicado um outro método mais sensível de detecção de relaxina, não na urina mas no sangue. Sendo imperativo que durante a gestação se evite o *stress* associado à manipulação, o sangue foi colhido mediante a utilização de insetos hematófagos da espécie *Dipetalogaster maximus*. Para este efeito as fêmeas de lince em cativeiro foram treinadas a utilizar placas de cortiça como locais de descanso, e as larvas deste inseto foram colocadas em recipientes embutidos nessas placas. Após 30 a 45 minutos de descanso ininterrupto das fêmeas nas placas com as larvas, estas foram colhidas e o sangue que elas tinham ingerido foi extraído e analisado. Os resultados dos testes feitos sobre o soro obtido do sangue colhido desta forma mostram resultados que se assemelham aos obtidos para o gato o que torna este método pouco invasivo numa forma rápida e fiável de fazer o diagnóstico de gestação quando usado entre os dias 34 e 56 após a primeira cópula (Braun et al., 2009). Num estudo posterior com vista a melhorar a sensibilidade deste teste (Braun, Vargas & Jewgenow, 2012) determinaram a sequência de ácido desoxirribonucleico (ADN) da relaxina do lince ibérico e desenvolveram um anticorpo específico para esta. Segundo o estudo, este novo anticorpo é visto como possível alternativa aos testes *Witness*<sup>®</sup> que utilizam anticorpos para a relaxina de cão.

Numa abordagem diferente à problemática do diagnóstico de gestação no lince ibérico foi realizado um estudo (Finkenwirth, Jewgenow, Meyes, Vargas & Dehnhard, 2010) em que testaram a possibilidade de fazer o diagnóstico através da medição de um metabolito da prostaglandina F<sub>2</sub> alfa(α). Os resultados deste estudo mostram ser possível fazer o diagnóstico de gestação através da medição do metabolito PGFM (13,14-dihidro-15-ceto-PGF<sub>2α</sub>) na urina com elevada sensibilidade dos resultados, pois este sofre um grande aumento nas fêmeas gestantes, o que não se verifica nos casos em que não houve gestação, incluindo nas fêmeas com pseudociese. No entanto os valores deste metabolito na urina só se tornam significativamente diferentes entre as fêmeas gestantes e as não gestantes a partir do dia 45 após a primeira cópula (Finkenwirth et al., 2010), o que significa um diagnóstico mais tardio quando comparado com o feito mediante relaxina (Braun et al., 2012). Contudo, existem dados que apontam para a frequente ocorrência de interrupções na gestação durante o ultimo trimestre em fêmeas primíparas, nestes casos mesmo após o

resultado positivo com o teste da relaxina, este outro teste pode ter importância na confirmação da gestação e na determinação da possível causa da interrupção (Finkenwirth et al., 2010). Além disso os resultados desse estudo (Finkenwirth et al., 2010) mostram ainda que além de ser detetável na urina, este metabolito pode ser também medido nas fezes com a mesma precisão e no mesmo intervalo de tempo, tornando-o uma ferramenta que pode ser aplicada com grande utilidade mesmo em animais de vida livre.

Outra área que pode ter grande importância na conservação do lince ibérico e que se encontra muito ligada à fisiologia reprodutiva é a das técnicas de reprodução assistida e de criopreservação aplicadas na criação de bancos de recursos genéticos (Roldan et al., 2009). A criação de um banco de recursos genéticos visa preservar a maior variedade genética possível e é especialmente importante em espécies com um número de indivíduos reduzido como é o caso do lince ibérico. A preservação de material genético é sobretudo relevante no caso de animais com menos ou nenhuma descendência, para que a sua genética individual não se perca. Assim, caso seja importante ou necessária para a população, essa genética pode ser recuperada e disseminada aumentando a sua representatividade mesmo após a morte desse indivíduo. Nestes bancos inclui-se uma grande variedade de material genético entre os quais se podem contar gâmetas de ambos os sexos, embriões e tecidos ou células somáticas (Roldan et al., 2009). A colheita de tecidos com células somáticas é feita ou através de biópsias realizadas durante os exames clínicos de rotina ou durante as necropsias. Este material pode depois ser utilizado em processos de clonagem que, embora controversos, permitem manter a totalidade da genética do indivíduo (Roldan et al., 2009). No caso dos gâmetas masculinos, além da preservação do sémen, é interessante conservar material testicular, especialmente de animais que morreram antes de ter oportunidade de ser reproduzir, pois é possível que este possa ser transplantado para outro macho com sucesso (Roldan et al., 2009). Da mesma forma no caso das fêmeas tanto oócitos como folículos primário e ovários devem ser preservados podendo o tecido ovárico ser utilizado em transplantes. Todo o material genético colhido para o banco é preservado através de técnicas de criopreservação que permitem a manter a sua viabilidade durante vários meses (Roldan et al., 2009).

#### **2.4.5. REINTRODUÇÃO**

Entende-se usualmente como reintrodução, a libertação de animais nascidos em cativeiro no meio selvagem. No entanto a IUCN (1998) segrega as libertações de animais em meio selvagem, definindo como reintrodução a tentativa de estabelecer a população de uma espécie numa área que faz parte da sua distribuição geográfica histórica, mas na qual a espécie se encontre extinta. A introdução de animais numa população já existente é definida como reforço ou suplementação e define-se translocação como a movimentação de animais entre populações distintas. Assim, o programa de conservação do lince ibérico pretende aumentar o número de lincos das populações já existentes através de reforços, aumentar a

sua diversidade genética mediante translocações e também criar novas populações recorrendo às reintroduções (Vargas et al., 2009).

Quanto ao método as libertações dividem-se em duas categorias, soltas brandas e soltas duras. As primeiras consistem em libertar os animais num cercado de adaptação na zona de reintrodução onde os animais permanecem durante um determinado período de tempo antes de serem completamente libertos. Estes cercados permitem uma adaptação ao meio ambiente selvagem gradual, um maior controlo das condições e ajudam a fixar os lince na zona de libertação. Por isso optou-se por numa fase inicial recorrer apenas as libertações deste tipo. No entanto este tipo de libertações acarreta custos no que diz respeito à manutenção do cercado e à alimentação dos lince e limita o número de libertações realizáveis pois o cercado destina-se a ser ocupado por apenas um casal de lince de cada vez. As soltas duras são libertações diretas para o meio selvagem e têm como vantagem o seu custo reduzido e a capacidade de libertar um maior número de animais no mesmo período de tempo. No projeto de conservação do lince ibérico ambos os tipos de soltas são utilizados, dependendo a escolha do tipo de solta das especificidades individuais de cada libertação (Simón et al., 2012).

As primeiras libertações de lince efetuadas ao abrigo do programa de conservação do lince ibérico foram translocações de lince provenientes da população de *Sierra Morena* com vista a aumentar a diversidade genética da população de *Doñana* (*Dirección General de Gestión de Medio Natural* [DGGMN], 2010). As translocações iniciaram-se em 2008 com um macho chamado Baya e ao final da temporada de cria de 2013/2014 tinham já sido introduzidos, por translocação, um total de seis lince (Mata, 2014).

As reintroduções propriamente ditas precisam, no entanto, de um trabalho suplementar que começa com a seleção dos futuros locais de reintrodução. Esta seleção deve ser rigorosa para garantir que os lince são libertados nas áreas onde têm maior probabilidade de sobrevivência e que mais beneficiam a população total da espécie. Entre os critérios utilizados na escolha das áreas de reintrodução podem contar-se a natureza da vegetação, a distância recursos hídricos, a área total da zona, a proximidade de outros núcleos populacionais, se o local é considerado uma área protegida, a disponibilidade de alimento e a sua densidade e a presença de perigos como caça ilegal ou presença de estradas entre muitos outros (Simón et al., 2012).

Depois de determinar quais os locais ideais para iniciar o processo de reintrodução é necessário preparar os locais de libertação, quase na totalidade constituídos por terrenos particulares cujos proprietários acordaram em participar na conservação do lince. Além disso é também necessário preparar toda a logística das libertações e dos métodos de seguimento utilizados após as soltas, essenciais para a obtenção de resultados acerca do sucesso do programa e para a sua avaliação (Simón et al., 2012).

Após este processo de triagem, os primeiros locais selecionados para proceder às reintroduções foram *Guadalmelatto* e *Guarrizas*. Foram primeiramente libertados em *Guadalmelatto* durante o mês de dezembro de 2009. As libertações foram feitas por solta branda e foram distribuídas por três momentos distintos. Em cada um desses momentos foi libertado um casal de lince, perfazendo um total de seis lince (três machos e três fêmeas), sendo que todos eles eram provenientes da população de *Sierra Morena*. No ano seguinte em *Guarrizas*, no dia 4 de dezembro foram libertados por solta branda cinco lince (dois machos e três fêmeas), sendo que duas das fêmeas libertadas tinham nascido em cativeiro fazendo desta a primeira libertação de animais nascidos nos centros de reprodução ao abrigo do programa de cria em cativeiro. Ao estabelecer estas duas zonas como primeiros locais de reintrodução tinha-se como objetivo criar população que crescessem a ponto de se unir à população de *Sierra Morena* pelo que num sentido mais restrito poderiam ser consideradas como reforços populacionais e não reintroduções plenas (Simón et al., 2012). Como estes locais de reintrodução também se encontram na região geográfica de *Sierra Morena*, para que seja possível a distinção entre as populações, a população inicial passa a ser tratada como população de *Andújar-Cardena* pois a sua distribuição abrange os parques naturais dessas duas regiões.

Na sequência destas libertações iniciais é necessário proceder a libertações anuais consistentes ao longo de vários anos para que seja possível atingir o objetivo de criar uma população estável, nesse sentido durante até ao final da época de cria de 2011/2012 foram libertados em *Guadalmelatto* um total de dezanove lince (sete dos quais nascidos em cativeiro) e dezasseis em *Guarrizas* (dos quais dez nasceram em cativeiro) (Mata, 2012).

Com o auxílio das libertações estas populações têm mantido um crescendo ao longo dos anos, e no censo publicado em abril de 2014 ambas as populações contavam já com mais de quarenta animais em cada uma. A par deste crescimento, verificou-se também um aumento nas deslocações de animais entre as populações de *Guadalmelatto* e *Guarrizas* e a população de *Andújar-Cardena*, sendo que até à data de publicação desse censo tinham já sido registadas vinte deslocações de animais entre essas populações. Este facto é um indicador positivo e vai ao encontro dos objetivos estabelecidos, tornando assim possível começar a considerar-se estas três populações como uma meta-população (Mata, 2014).

Até meados de 2014 as libertações mantiveram-se restritas a estes locais, mas durante a época de cria de 2014/2015 foram inaugurados quatro novos locais de reintrodução, *Sierra Morena Oriental*, na região de *Castilla-La Mancha*, mas ainda perto da meta-população de *Guadalmelatto-Cardena-Andújar-Guarrizas*, existindo já registo de um animal que se deslocou até essa zona, *Montes de Toledo*, também em *Castilla-La Mancha* mas numa zona mais a norte, *Hornachoz* perto de *Badajoz* na zona da *Extremadura* e o Vale do Guadiana em Portugal (Iberlince, 2014a, 2014b, 2014c, 2014d). Com isto, no âmbito do programa de conservação do lince ibérico foram já libertados nas zonas de reintrodução mais de 125

lince, sendo que perto de uma centena destes são lince nascidos ao abrigo do programa de cria em cativeiro (Iberlince, 2015).

No ano inaugural do programa de re-introdução em Portugal, foram libertados no Vale do Guadiana em Portugal um total de dez lince ibéricos (cinco machos e cinco fêmeas), nascidos entre 2012 e 2014 nos centros de cria. As libertações ocorreram entre 16 de dezembro de 2014 e 14 de maio de 2015, sendo que na sua maioria se trataram de soltas brandas. Apenas os dois últimos animais, foram libertados mediante o processo de solta dura (ICNF, 2015).

Com o final das libertações da presente época 2015/2016, o número de lince libertados ascende já a 170, sendo que desses, 141 são lince que nasceram em cativeiro nos vários centros de reprodução (Geraldos, 2016).

#### **2.4.6. SENSIBILIZAÇÃO E EDUCAÇÃO**

Para o sucesso de qualquer programa de conservação é fundamental o apoio da população, assim a sensibilização e educação das pessoas é uma tarefa importante que não deve ser descurada. Os esforços nesta área devem ser dirigidos para a alteração de comportamentos que prejudiquem o *habitat* ou as espécies que nele vivem. Neste sentido os programas de conservação desempenham um grande papel na conservação do *habitat* como um todo, pois são normalmente alvo de grande mediatismo. Este efeito é sobretudo sentido em espécies emblemáticas e carismáticas a que a população dá mais atenção, como é o caso do lince ibérico. Assim o projeto de conservação do lince ibérico deve alertar sempre que possível para a importância do equilíbrio do ecossistema na sobrevivência desta espécie (Vargas et al., 2009). Um exemplo recente de como um animal emblemático com o lince pode ser embaixador de uma causa maior, é o caso da Kayakwero, um lince ibérico fêmea libertado em Portugal no dia 7 de fevereiro do presente ano. Sendo que a libertação foi efetuada por solta branda, só no dia 4 de março é que a fêmea abandonou o cercado de adaptação. Foi encontrada morta na manhã de dia 12 desse mês e a necrópsia revelou que a morte se tinha devido a envenenamento (INCF, 2015). A morte da Kayakwero serviu assim para alertar a população para uma situação problemática recorrente em Portugal, a colocação ilegal de venenos para controlo de predadores. Esta prática atinge animais ao longo de toda a cadeia alimentar e pode pôr em causa a sobrevivência do ecossistema (Álvares, 2003).

#### **2.5. MANEIO SANITÁRIO E ASPECTOS MÉDICO-VETERINÁRIOS**

Uma das vertentes da preservação de uma espécie que qualquer programa de conservação tem de abranger é o manejo sanitário da população. Devido ao potencial de transmissão de doenças entre os animais de provenientes de cativeiro e os de vida livre, tanto as libertações como as introduções de novos animais num programa *ex situ* são uma fonte constante de preocupações. Para evitar que este contágio ocorra é importante conhecer os estados epidemiológicos de ambas as populações, desenvolver uma boa metodologia de quarentena

e criar um sistema de vigilância epidemiológica. Devido à falta de conhecimento que existia no início do programa acerca das principais doenças que afetavam o lince ibérico, estas foram extensivamente estudadas e foram desenvolvidos protocolos de prevenção rigorosos para a população de cativeiro. A par disso foi também feita pesquisa nas populações selvagens e de cativeiro para determinar os valores fisiológicos normais para a espécie para parâmetros como os valores sanguíneos, importantes no diagnóstico de várias doenças. Esta investigação e a partilha dos resultados obtidos através dela é a chave para que se possa conseguir um sistema de diagnóstico e tratamento consistente (Vargas et al., 2009). Esse trabalho desenvolvido e outros aspetos veterinários respeitantes ao lince ibérico são coordenados pelo GAASLI. Este grupo é assim responsável pela elaboração e implementação dos protocolos médicos, e também pelas anestésias, exames e necrópsias efetuadas, pela colheita de amostras, manutenção de uma base de dados biomédicos e elaboração de relatórios técnicos (Martínez et al., 2009).

Após esta introdução, segue-se uma análise mais detalhada das diferentes doenças infecciosas e não infecciosas que mais frequentemente atingem o lince ibérico.

### **2.5.1. DOENÇAS INFECCIOSAS**

O pequeno número de indivíduos que constituem o total da população de lince ibérico, a fragmentação dessa população e a reduzida variabilidade genética da mesma, colocam esta espécie numa posição vulnerável face à presença de agentes infecciosos, mesmo daqueles que noutros felinos não seriam altamente patogénicos. Nesse sentido, era necessário conhecer, na população de lince ibérico, a prevalência e a importância clínica dos agentes patogénicos infecciosos mais nocivos noutras espécies de felinos. Para responder a esta necessidade foi iniciado em 2003 um estudo para determinar a prevalência na população selvagem de Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Herpesvírus Felino (FHV), Calicivírus Felino (FCV), Parvovírus Felino (FPV), Coronavírus Felino (FCoV), Vírus da esgana (CDV), Vírus da Leucemia Felina (FeLV), *Bartonella henselae*, *Chlamydophila felis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus mycoplasma haemominutum*, *C. mycoplasmas turicensis* e *Cytauxzoon felis* (Meli et al., 2009).

Dos agentes patogénicos testados nesse estudo, foram encontrados animais positivos para todos eles com exceção do FIV que não foi detetado em nenhum dos indivíduos (Meli et al., 2009). O FIV foi detetado pela primeira vez no lince ibérico, num caso isolado observado no ano de 2015 (R. Serra, comunicação pessoal, Setembro 20, 2016). No seu estudo, Meli et al. (2009) registou também uma prevalência de FHV, FCV, FPV e FCoV bastante maior que aquela que se verifica nos lincos euroasiáticos na Suécia. Isto pode dever-se a uma maior densidade populacional no caso do lince ibérico e à proximidade elevada destes com os meios humanos onde o contato com gatos domésticos acontece com mais frequência. Outra situação que, segundo este estudo, poderá ter tido origem na proximidade entre o lince ibérico e o gato doméstico é o surto de FeLV que em 2007 atingiu vários animais da

população de *Doñana*, que mais tarde acabariam por morrer. A patogenicidade deste surto foi surpreendente, no entanto elevada taxa de mortalidade poderá estar mais ligada à debilidade dos hospedeiros do que à patogenicidade do vírus, uma vez que este foi identificado como sendo de uma estirpe pouco patogénica e proveniente da população de gatos domésticos sem que tenha sofrido alterações. Os dados do estudo sugerem que o vírus talvez seja introduzido esporadicamente na população de lince de *Doñana* não estando em circulação dentro desta. Deste modo, e tendo em conta o efeito que uma estirpe pouco patogénica no gato doméstico pode ter sobre a população de lince ibérico, é muito importante a aplicação de um programa vacinal tanto nos lince, para que desenvolvam algum grau de imunidade, como nos gatos domésticos para que a pressão do vírus seja minimizada. A par disso deve ser executado um programa de vigilância nas zonas de distribuição geográfica do lince e nas futuras zonas de reintrodução (Meli et al., 2009).

Nos animais capturados com vista a serem introduzidos no programa de reprodução em cativeiro, são pesquisados todos estes agentes durante o período de quarentena durante o qual são sujeitos a dois exames clínicos (sob anestesia) e também vacinados. Durante este período os animais são também observados através do sistema de videovigilância para complementar a informação recolhida durante os exames clínicos. Só após a análise de toda a informação obtida durante a quarentena é que os animais podem ser considerados como aptos a juntar-se ao programa e então passar às instalações onde permanecem os animais do programa de reprodução em cativeiro. O programa de vacinação utilizado nos centros de reprodução é composto por duas vacinas, a Pentofel<sup>®</sup> da Zoetis, uma vacina inativada pentavalente com ação contra FCV, FPV, FHV, FeLV e *Ch. felis*, e a Purevax<sup>®</sup> FeLV da Merial, uma vacina recombinante para reforçar a imunidade contra o FeLV. Nas crias a primovacinação é realizada por volta dos sessenta dias na altura em que são sujeitas ao seu segundo exame físico, e mais tarde às doze semanas é feito o reforço, novamente aproveitando o exame clínico de rotina. Nos animais introduzidos no programa vindos de vida livre, esta vacinação é feita nos dois exames clínicos, separados por cerca de quatro semanas, que são realizados durante a quarentena. Depois disto, tanto crias que se mantenham no programa de reprodução como os novos animais, são vacinados passado um ano, e novamente no ano seguinte. Após esse período as vacinações passam a ser feitas apenas uma vez a cada dois anos aquando do exame clínico de rotina. Como prevenção contra possíveis surtos de FeLV, os animais de vida livre, sempre que por algum motivo sejam capturados e caso o resultado do teste rápido do FeLV seja negativo, são vacinados com a mesma vacina recombinante usada no programa de reprodução (Martínez et al., 2009; GMSLI, 2014).

No que diz respeito à parte das parasitoses, à semelhança do que acontece em muitos animais selvagens o lince ibérico convive com uma fauna parasitária muito diversa que faz desta espécie o seu hospedeiro. A nível de parasitismo interno conhecem-se no lince pelo

menos doze espécies de helmintes incluindo *Taenia pisiformis*, *T. taeniaeformis*, *T. polyacantha*, *Mesocostoides litteratus*, *Brachylaima* sp., *Eucoleus aerophilus*, *Ancylostoma tubaeforme*, *Toxocara cati*, *Toxascaris leonina*, *Mastophorus muris*, *Vigisospirura potekhina* e *Physaloptera praeputialis* (Torres, García-Perea, Gisbert & Feliu, 1998). Ao nível do parasitismo externo a fauna parasitária é igualmente extensa com novas descobertas a serem feitas nesta área frequentemente, contando com várias espécies de carraças, pulgas, piolhos e moscas da família *Hippoboscidae* (Millán et al., 2007). Destes parasitas é de destacar o caso do insecto *Felicola (Loricola) isodoroi*, um piolho que, tanto quanto se sabe, parasita apenas o lince ibérico e que com a ameaça de extinção do seu hospedeiro enfrenta também o perigo de se extinguir. Para agravar a situação desta espécie de piolho, o lince ibérico tem sido alvo de uma pressão de desparasitação, sobretudo nos animais mantidos em cativeiro, o que pode comprometer a sua sobrevivência. Esta situação tem levantado algumas questões acerca da possível utilidade ou obrigação da conservação desta espécie ou de outros parasitas em situação semelhante (Pérez, Sanchez & Palma, 2013).

No entanto, apesar da grande diversidade parasitária, raramente os parasitas são causa de problemas no lince ibérico, e apenas são prejudiciais em situações de animais que se encontram à partida com alguma debilidade imunitária. No entanto como medida preventiva de eventuais surtos de grande dimensão e como medida de controlo de zoonoses parasitárias, os lincos inseridos no programa de reprodução são periodicamente desparasitados. Para a desparasitação externa, o mais comum é a utilização de pipetas insecticidas com selamectina (Stronghold®) ou fipronil (Frontline Combo®). Ao nível da desparasitação interna dos lincos adultos, o protocolo mais frequente recorre à combinação de pirantel e praziquantel (Drontal Gatos®), sendo que nas crias, o desparasitante interno mais utilizado é o pirantel (Canex Gatos®). Os lincos das populações silvestres são desparasitados segundo o mesmo protocolo, mas apenas no caso de sofrerem de uma parasitose muito exuberante, ou aquando das translocações entre diferentes populações de lincos (GMSLI, 2014).

No campo das doenças infecciosas há ainda que considerar o grupo das zoonoses, que apesar de ser composto por doenças que podem não ter grande representatividade na mortalidade ou morbilidade do lince ibérico, representam um perigo de saúde para as pessoas que trabalham de perto com esta espécie. Dentro dos agentes com potencial zoonótico que podem ser encontrados no lince, contam-se agentes bacterianos (*Salmonella* sp, *Mycobacterium bovis* e *Leptospira interrogans*), fúngicos (*Trichophyton* spp e *Microsporum* spp), parasitários (*Toxocara canis*, *T. cati*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma* sp, *Echinococcus multilocularis*, *Dipilidium caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Borrelia burgdorferi* e *Sarcoptes scabiei*) e virais (*Lissavirus* da raiva).



Como meio de proteção para as pessoas que trabalham com os lince em cativeiro, para além do programa de desparasitação e vacinação dos animais, foram implementadas medidas de biossegurança para controlo de risco no ambiente. Dentro destas medidas são de salientar a utilização obrigatória de equipamento de proteção individual, se possível descartável e a existência de mudas de roupa para uso exclusivo quer nos cercados onde se encontram os lince quer na clínica veterinária. Foram definidos protocolos de higienização, tanto dos trabalhadores (antes e depois do contacto com os animais) como do equipamento e superfícies (após a sua utilização), utilizando produtos de limpeza com ação bactericida, viricida, esporicida e fungicida e também diretrizes para a correta manipulação de amostras e do respetivo material de colheita (GMSLI, 2014).

### **2.5.2. DOENÇAS NÃO-INFECIOSAS**

No mesmo âmbito de tentar perceber melhor que doenças afetam o lince ibérico, foi realizado um estudo baseado em necrópsias minuciosas, acompanhadas de avaliações histológicas em lince mortos de ambas as populações de lince ibérico. Nesse estudo identificaram-se na população indícios de glomerulonefrite, depleção linfóide e de hialinose esplénica focal, encontraram-se também algumas situações de lesões de tuberculose e de carcinomas das células escamosas, embora menos frequentes que as primeiras situações. Devido a esses achados, foram então iniciados estudos clínicos para proceder à avaliação do aparelho urinário e sistema imunitários dos indivíduos dessas populações. No decorrer dessa análise, foi possível constatar que numa grande parte da população a resposta imunitária se encontrava de facto reduzida, acompanhada de uma diminuição do número de linfócitos B e T. A função renal foi avaliada utilizando a classificação da *International Renal Interest Society* (IRIS), segundo a qual a maioria dos animais avaliados apresentava já algum grau de doença renal crónica (DRC) (Jiménez et al., 2009).

No decorrer do ano 2009 surgiu dentro da população de lince do programa de reprodução em cativeiro um surto de DRC que causou um grande pânico no seio da equipa do projeto. Esta situação levou à tomada de medidas imediatas de prevenção tanto ao nível da biossegurança, passando o manejo dos animais a ser feito como se cada um deles estivesse em quarentena, como ao nível do manejo médico, sendo que todos os procedimentos e tratamentos que pudessem ter algum efeito nocivo sobre o aparelho renal foram substituídos dentro do possível e iniciou-se o tratamento sintomático para DRC em todos os animais afetados. No seguimento deste surto foram examinados a nível do funcionamento renal todos os lince do programa. Destes exames concluiu-se que cerca de 60% da população de cativeiro apresentava alterações renais (funcionais e/ou morfológicas). Após determinada e corrigida a causa de origem deste surto, os quadros clínicos dos animais estabilizaram. Concluído o diagnóstico definitivo do grau de DRC e de quais os animais afetados, iniciou-se o tratamento para minorar os sinais urinários da DRC e as alterações secundárias a esta, assim como a alteração da dieta para uma com um menor

teor proteico. Entre a data do surto e setembro de 2013, um total de dezasseis lince do programa de reprodução em cativeiro morreram devido a complicações da DRC, sendo que estas perdas afetaram gravemente os resultados do programa no ano de 2010 e os efeitos ainda se fizeram sentir na época de reprodução seguinte. Após estas mortes a doença tem estado sob controlo e os animais afetados continuaram o tratamento. Mantem-se também uma especial atenção ao comportamento destes animais, em especial ao tempo que passam a beber água, tentando identificar algum sinal de polidipsia que possa indiciar uma descompensação a nível renal (GMSLI, 2014).

Além das doenças já mencionadas, que foram identificadas através do estudo a nível histológico, conhecem-se também algumas outras causas de doença no lince ibérico quer pelo acompanhamento que se faz ao nível dos animais selvagens, quer pela grande pressão de vigilância que se tem sobre os animais do programa de reprodução em cativeiro. Uma das afeções mais frequentemente observadas em ambos os ambientes são os traumatismos. No caso dos animais de vida livre, estes podem ser divididos entre traumatismos resultantes de lutas, que podem resultar tanto do confronto entre lince como destes com animais de outras espécies, e traumatismos com causa antropogénica entre os quais se contam os atropelamentos, disparos de arma de fogo e armadilhas para animais. Já nos animais de cativeiro, os traumatismos resultam principalmente das interações entre crias da mesma ninhada durante o período de lutas. Uma outra afeção que já foi observada algumas vezes nos animais de cativeiro, apenas possível devido à grande vigilância de que são alvo, consiste no desenvolver de quadros convulsivos. Esta situação ocorre mais frequentemente nos animais entre os 62 e os 157 dias de vida. Apesar destes quadros convulsivos serem de origem idiopática, existe possivelmente uma componente genética associada à doença. Entre as afeções menos frequentes, mas que também já foram descritas no lince ibérico, encontram-se por exemplo, a necrose da cabeça do fémur, o quilotórax e o otohematoma. Relativamente à necrose da cabeça do fémur, existem três casos conhecidos (com contornos semelhantes à síndrome de Legg-Calve-Perthes canina). Sendo possível que a doença tenha também uma componente genética, as causas da mesma são ainda desconhecidas. No campo das neoplasias, as que surgem com maior frequência no nível do lince ibérico são o carcinoma das células escamosas, os tumores mamários, os tumores ováricos e os sarcomas musculares (GMSLI, 2014).

## **2.6. ANESTESIA**

A palavra anestesia deriva do grego (*an-* ausência e *aesthēsis* sensação) e significa insensibilidade. No contexto médico é utilizada para descrever a falta de sensibilidade generalizada ou de uma zona específica do corpo. Quando generalizada caracteriza-se por um estado de inconsciência, acompanhada de uma depressão do sistema nervoso central, sendo que neste estado o indivíduo não responde a qualquer estímulo, incluindo estímulos nocivos. A par da anestesia é também costume falar-se de sedação, estado de depressão

do sistema nervoso central, geralmente acompanhado de sonolência e relaxamento muscular. Num estado de sedação o indivíduo encontra-se normalmente alheio aos estímulos do ambiente que o envolve mas mantém a capacidade de resposta a estímulos nocivos. Neste contexto é também importante falar do conceito de analgesia, sendo analgesia o estado de ausência de sensação de dor em resposta a estímulos que normalmente seriam dolorosos. À semelhança do que acontece com a anestesia, a analgesia pode ser geral ou localizada a uma região do corpo (Tranquilli & Grimm, 2015).

No contexto médico, a utilização adequada de fármacos capazes de induzir um ou mais destes três estados pode conseguir alívio da dor, relaxamento muscular e amnésia. Estas são ferramentas indispensáveis no manejo médico e para o bem-estar dos pacientes, em situações que vão desde a imobilização para diagnóstico ou intervenções cirúrgicas, à segurança no transporte de espécies de selvagens. No âmbito médico-veterinário estes fármacos constituem também um dos métodos para a realização da eutanásia (Tranquilli & Grimm, 2015).

A imobilização química é muitas vezes necessária quando o paciente é um animal selvagem, esta pode no entanto ser extremamente complexa nesses casos. A falta de informação acerca do historial do animal a anestesiá-lo, a impossibilidade da realização de exames prévios e a dificuldade da avaliação do estado geral do animal, leva a que os animais sejam por norma considerados saudáveis, o que pode não ser verdade, tornando-se um risco para a vida do animal. A par disso, existem vários agentes externos ligados ao ambiente, como acidentes geográficos ou temperaturas extremas, que podem representar um risco para a saúde do animal durante a captura. Somam-se a estes fatores a comum falta de informação acerca da espécie, que leva a que seja necessário extrapolar protocolos anestésicos, as limitações na utilização de meios de suporte de vida mais tecnológicos e o *stress* causado no animal pelo evento da captura. Assim no seu conjunto a anestesia de um animal selvagem é um processo difícil e com riscos elevados, pelo que deve ser sempre bem avaliada a sua necessidade (Caulkett & Arnemo, 2015).

Em seguida são analisadas em maior detalhe as diferentes etapas constituintes de um episódio de captura de um animal selvagem, começando com a preparação da mesma, passando pelos diferentes métodos de contenção, protocolos anestésicos utilizados e pelo manejo anestésico de um animal selvagem.

### **2.6.1. PREPARAÇÃO**

Num centro de reprodução de qualquer espécie, todas as intervenções médicas necessárias devem ser sempre realizadas da forma menos invasiva e que cause menos *stress* nos animais. No entanto, para alguns procedimentos é indispensável a captura e anestesia dos animais, sendo que nessas situações a necessidade da intervenção deve ser bem ponderada, pois uma intervenção deste género é acompanhada de riscos e de algum grau de perda de confiança do animal para com os tratadores (Vargas et al., 2006).

A avaliação da necessidade de recorrer à anestesia não é necessariamente fácil, uma vez que o risco da anestesia e de complicações associadas à mesma, pode ser maior que o risco que o animal corre se não sofrer a intervenção. No entanto, o contrário também se pode verificar, e algo aparentemente simples e que parece não justificar a necessidade de uma intervenção médica pode evoluir rapidamente e de forma a pôr em risco a vida do animal (GMSLI, 2014). Deste modo, tendo em conta a importância que a sobrevivência de cada exemplar de lince ibérico tem para o futuro da espécie, torna-se indispensável que nos casos em que seja necessário um manejo anestésico nesta espécie, este se faça recorrendo aos métodos e fármacos que comprovadamente acarretem o menor número de riscos e com mínimo de efeitos secundários descritos (Gómez-Villamandos et al., 2007).

Antes de tomar uma decisão final acerca da captura e anestesia do lince é essencial fazer com os elementos disponíveis a melhor anamnese possível. No caso dos animais em cativeiro a observação deve ser feita de forma direta pelos tratadores, pois são quem melhor conhece a individualidade dos animais e aqueles cuja presença altera menos o comportamento dos lince, e de forma indireta através da videovigilância que permite uma observação continuada (GMSLI, 2014).

Nos animais de vida livre a recolha de informação através da observação é muito mais limitada, não sendo normalmente possível realizar um exame pré-anestésico cuidado. Desta forma o estado de saúde dos animais é complicado de avaliar. Na falta de sinais evidentes em contrário, estes são muitas vezes considerados saudáveis e a anestesia é preparada como tal (Caulkett & Arnemo, 2015). Para a observação de animais de vida livre, os principais métodos utilizados são a foto-armadilha, que permite observar problemas muito evidentes como feridas de grande dimensão, e o seguimento à distância por rádio, que pode ser utilizado para deteção de alterações nos padrões de movimento dos animais. A observação direta destes animais não é tão fácil de conseguir como o acompanhamento através de métodos indiretos, mas pode ser muito útil na deteção de vários problemas mais notórios (GMSLI, 2014).

Durante a observação pré-anestésica, quer de animais em cativeiro quer de animais de vida livre, é necessário avaliar dentro do possível o estado de saúde do animal, sendo que isto permite determinar o risco anestésico a que o animal estará sujeito e as prioridades médicas no momento da anestesia. Nesta avaliação é necessário dar uma especial atenção aos sistemas cardíaco e respiratório, pois estes são deprimidos pela maior parte dos anestésicos, e a sua falência está entre as principais causas de morte durante a anestesia (Brodbelt, Flaherty & Pettifer, 2015). No caso dos animais de vida livre esta observação deve também ser utilizada para estimar o peso do animal e avaliar as situações de perigo relacionadas com o ambiente que podem surgir durante o episódio de captura (Caulkett & Arnemo, 2015). Caso seja possível, é útil a recolha de amostras de fezes e de urina para efetuar as análises que permitam avaliar melhor o estado de saúde do animal ou que sejam

necessárias para eventuais estudos sobre a espécie. Todos os resultados devem ser ponderados com o historial clínico do animal e só então se decide se é ou não necessária a captura. Nesta fase de avaliação é importante recordar que os lince ibéricos (mesmo os nascidos em cativeiro) são animais selvagens, como tal vão mascarar o mais possível sinais de doença ou dor, assim é determinante prestar atenção a qualquer sinal por mais pequeno que seja. Isto é importante também aquando da preparação da anestesia, uma vez que o risco anestésico real pode ser superior ao inicialmente estimado tendo como base apenas a observação do animal (GMSLI, 2014).

Antes de passar à captura e anestesia do animal é importante planear todo o procedimento e preparar todo o material que possa ser necessário. Nesta preparação devem incluir-se todos os utensílios que vão ser necessários para a colheita de amostras assim como os respetivos meios de armazenamento. No entanto, o mais importante é que deve ser feita a verificação e preparação de todos os fármacos e equipamento necessários para o exame clínico previsto e para qualquer emergência médica que possa surgir (Vargas et al., 2006; GMSLI, 2014). Nas capturas de animais de vida livre são também importantes outros aspetos logísticos como a verificação das vias de comunicação e o estabelecimento de planos de evacuação (Caulkett & Arnemo, 2015). É também importante salientar que qualquer anestesia só deverá ser realizada por pessoal qualificado, experiente e sempre com o acompanhamento de uma equipa médico-veterinária com pelo menos dois médicos (GAASLI, 2004).

### **2.6.2. CONTENÇÃO**

A captura de animais selvagens pode ser inicialmente feita quer por meios físicos quer por meios químicos, sendo que com alguns animais e equipas experientes é possível trabalhar apenas com recurso a uma boa contenção física (Caulkett & Arnemo, 2015). No caso do lince ibérico a contenção química é indispensável, podendo nalguns casos ser utilizado previamente algum método de contenção física. A contenção química faz-se recorrendo a fármacos com efeito anestésico, portanto a dose necessária para a indução anestésica deve ser cuidadosamente calculada para cada caso específico (GAASLI, 2004). Para isso é importante conhecer o estado geral de saúde do animal, nomeadamente de fatores que afetem a farmacocinética de um fármaco como o grau de desidratação e a condição corporal (Turnheim, 2003). Ao contrário do que acontece nos animais mantidos em cativeiro, que são pesados regularmente e onde existem meios para que eles possam ser pesados com relativa precisão antes da indução anestésica, nas capturas de animais de vida livre é necessário estimar o seu peso através da observação. Para conseguir realizar essa tarefa com segurança é necessário não só conhecer os intervalos de peso normais para os indivíduos da espécie, como também estar treinado para estimar o peso de um animal através da sua observação (GAASLI, 2004).

Sempre que possível os animais a ser anestesiados devem fazer um jejum de 24h de sólidos e 12h de líquidos (ou 24h de líquidos no caso de machos em que se pretenda fazer eletroejaculação) (GAASLI, 2004). Nos animais de vida livre, mesmo o jejum de sólidos é difícil de garantir, uma vez que para capturar os animais é muitas vezes utilizada uma presa como isco, e os animais acabam por se alimentar dela. Assim, apesar de serem raros os registos de vômito durante a anestesia, nestes casos é da maior importância a entubação endotraqueal para evitar possíveis pneumonias por aspiração (GMSLI, 2014). As capturas devem ser programadas para o início ou final do dia, por forma a evitar o período de maior calor. Nos casos em que tenha de ser feita uma perseguição ao animal esta deve ser limitada a um máximo de cinco minutos. Estas medidas permitem diminuir as hipóteses do episódio da captura e o *stress* associado levarem a situações de hipertermia, miopatia de captura, traumatismos ou outras complicações (GMSLI, 2014; Caulkett & Arnemo, 2015).

No que diz respeito à indução da anestesia, esta pode ser feita com ou sem a contenção física do animal. Se possível, e para que a indução possa ser feita com maior segurança, a contenção física prévia do animal deve ser realizada (GMSLI, 2014).

Para a realização da contenção física do lince ibérico existem vários métodos possíveis. No caso de animais mantidos em cativeiro, na manipulação de crias até às 12 semanas, estas podem ser contidas manualmente, recorrendo a luvas de couro como proteção. Em animais maiores a contenção pode ser feita com uma rede ou caça mariposas. Este método de captura só pode ser utilizado em espaços fechados e causa muito *stress* no animal que é ativamente perseguido. Por isso, deve ser realizado por pessoas com grande prática na sua utilização, para que o evento de captura seja o mais breve possível. A indução é feita manualmente depois de capturado o animal. É necessário nesse procedimento a utilização de luvas de couro, pois existe o risco de mordeduras ou arranhadelas. Antes do momento da captura devem ser removidos da instalação todos os equipamentos que possam causar dificuldade à mesma (GMSLI, 2014).

No entanto, o melhor método e o mais utilizado para a captura de exemplares de lince ibérico é a captura por jaula-armadilha. Este método de captura é fácil de utilizar, bastante seguro e pode ser utilizado tanto para animais de cativeiro como animais de vida livre. O funcionamento deste método baseia-se na colocação de uma presa do lince dentro da jaula que funciona como isco atraindo o lince. Quando o lince entra na jaula esta ativa-se automaticamente (através de um sistema mecânico acionado pelo peso do lince dentro da jaula) e fecha-se, ficando o lince no seu interior. A utilização deste método em meio selvagem implica que as jaulas sejam deixadas sem vigilância constante, pelo que estas devem ser verificadas no mínimo a cada oito horas. Caso haja probabilidade de capturar uma fêmea gestante ou uma cria o período entre verificações deve ser reduzido para quatro horas. Por segurança, as jaulas devem ser colocadas em zonas abrigadas, ficando protegidas quer de chuva quer de sol direto, e em dias em que a temperatura chegue aos

35°C, as jaulas devem ser desativadas entre as 10:00 e as 19:00. Antes da colocação e a cada revisão, é necessário verificar o correto funcionamento da jaula. De preferência a jaula deverá estar equipada com um sistema de alerta que avise assim que a jaula for ativada (por sinal de rádio ou mensagem de texto para o telemóvel). Depois de capturado, o lince deve ser passado para uma jaula de contenção (que permita a compressão do animal contra uma das paredes) para que possa ser induzida a anestesia em segurança. Com os animais de cativeiro o processo é bastante semelhante, mas as jaulas são vigiadas através das câmaras de vídeo e normalmente as jaulas utilizadas têm já a função de jaula de compressão pelo que não é necessário mudar o animal de jaula (GMSLI, 2014). Depois de administrada a anestesia, a jaula deve ser coberta com uma manta escura e apenas o anestesista se deve manter perto do lince controlando periodicamente o seu estado de consciência (GAASLI, 2004).

Caso não se faça contenção física, a indução tem de ser feita à distância com um dardo. Uma vez que o animal não está imobilizado no momento da indução é necessário tomar precauções relativas à segurança do animal e da equipa de captura (GAASLI, 2004). Em primeiro lugar é importante tentar que o processo de perseguição do animal provoque o mínimo de *stress*, isto porque o tempo de indução em animais agitados pode ser muito superior ao observado para a mesma espécie em animais calmos (Caulkett & Arnemo, 2015). Outros fatores podem também influenciar o tempo de indução incluindo a condição física, idade, sexo e sensibilidade ao fármaco utilizado. No entanto, um dos fatores mais determinantes para este tempo é o local de administração do fármaco, devendo a injeção ser feita em zonas de grandes massas musculares (como o ombro, o pescoço ou os membros posteriores) para que a absorção seja mais rápida, encurtando o tempo de indução (Caulkett & Arnemo, 2015). Assim, é muito importante conhecer bem a anatomia do animal que se pretende anestesiar. Para além disso é também necessário conhecer a biologia da espécie, pois no caso de animais que hibernem, existe a tendência para criar grandes depósitos de gordura no período imediatamente antes à hibernação, devendo as zonas de principal acumulação de tecido adiposo ser evitadas aquando do disparo pois são menos irrigadas e como tal o fármaco iria demorar mais tempo a atingir uma concentração no sangue para fazer a indução anestésica (Caulkett & Arnemo, 2015). O disparo não deve ser feito com o animal em movimento, para evitar atingir zonas mais sensíveis (como o tórax ou a cabeça). Na altura do disparo o animal não deve estar perto nem de zonas de água nem de acentuado declive, onde o animal possa cair ou magoar-se durante o tempo que decorre entre o tiro e o momento em que o animal fica em decúbito devido ao efeito da anestesia (GAASLI, 2004). Após o momento em que o dardo com o fármaco atinge o animal deve registar-se a hora e manter uma vigilância constante durante o período de indução para garantir a segurança do animal (Caulkett & Arnemo, 2015).

No caso do lince ibérico, o disparo pode ser feito recorrendo a vários métodos. O mais simples deles é a zarabatana, que não deve ser utilizada a mais de cinco metros de distância pois tende a perder a precisão em distâncias maiores e tem um impacto reduzido. Isto torna-a ideal para utilizar em animais que se encontrem em recintos fechados, como é o caso dos lincos do programa de reprodução em cativeiro. A pistola de dardos permite disparos a uma distância maior, no entanto acarreta mais riscos para o animal devido ao forte impacto do dardo, sendo aconselhável o seu uso apenas por pessoas com experiência. Existe um outro método de anestesia à distância que envolve a utilização de uma pistola de dardos ligada a um sistema de vídeo e controlo remoto. Este equipamento permite disparos até duzentos metros de distância e já foi utilizado com sucesso em lincos ibéricos em estado selvagem. A utilização de dardos com localizador pode ser importante nestes casos, uma vez que a grande distância a que se faz o tiro pode tornar difícil encontrar o animal (GMSLI, 2014). Para os disparos devem ser utilizados dardos com agulhas curtas, porque são menos traumáticas e suficientes para um animal do porte do lince ibérico. No caso de um tiro não correr bem e existirem dúvidas acerca da quantidade de fármaco que terá sido injetado, deve aguardar-se dez minutos antes de fazer o reforço anestésico (GAASLI, 2004). Para este tipo de situações em que existe um desperdício ou no caso de animais que precisam de reforço anestésico, é conveniente ter à disposição doses dos fármacos superiores às que estaria programado utilizar, sendo que este excedente deve ser na ordem dos 50% dessas doses (Arnemo, Evans, Fahlman & Caulkett, 2014). A aproximação a um animal que tenha sido atingido com um dardo deve ser feita com muita cautela, mantendo uma distância de segurança à qual se possa fazer uma observação que permita perceber se existem movimentos voluntários. Nesta fase é importante conhecer os efeitos dos fármacos utilizados na indução pois existem fármacos que permitem a existência de alguns movimentos involuntários em animais com uma indução bem conseguida. Só depois de se ter a certeza de que o animal está sob uma correta imobilização química, testando primeiro a resposta a estímulos auditivos e depois a estímulos táteis, é que se deve realizar a aproximação para verificar o estado de saúde do animal, iniciar a monitorização dos sinais vitais e as restantes práticas de manejo de animais anestesiados (Caulkett & Arnemo, 2015).

### **2.6.3. PROTOCOLOS ANESTÉSICOS**

Os protocolos anestésicos são combinações de diferentes fármacos, utilizados com o objetivo de anestésiar um animal. Sendo verdade que não existe um protocolo que possa ser considerado universalmente correto, através da experiência obtida e partilhada, foram definidas como protocolos algumas combinações de fármacos, pela segurança e eficácia que demonstraram no caso do lince ibérico. Esses protocolos envolvem normalmente combinar um sedativo  $\alpha 2$  adrenérgico com a cetamina como agente anestésico, ambos em doses baixas (GMSLI, 2014).



Os agentes  $\alpha_2$  adrenérgicos são amplamente utilizados em medicina veterinária pois possuem uma excelente função tanto sedativa como analgésica (Murrell, 2015). A par destes efeitos os  $\alpha_2$  adrenérgicos proporcionam também um estado de relaxamento muscular. A ampla distribuição dos recetores  $\alpha_2$  leva a que estes fármacos produzam efeitos não desejados em vários sistemas do organismo. Ao nível do sistema nervoso central, estes fármacos podem afetar a perfusão sanguínea do cérebro pelo que devem ser utilizados com cautela em animais com alterações hemodinâmicas intracranianas. No aparelho respiratório os efeitos não são muito sentidos quando utilizados sem outros fármacos, sendo que quando utilizados em protocolos combinados tende a existir uma depressão respiratória. Relativamente ao aparelho gastrointestinal é frequente uma diminuição da motilidade. No entanto é ao nível do sistema cardiovascular que os efeitos destes fármacos podem causar mais preocupações pois induzem uma bradicardia que pode ser persistente (Rankin, 2015).

Por seu lado a cetamina é considerado um anestésico dissociativo, induzindo uma anestesia em que o animal não se encontra adormecido mas sim alheado da realidade não respondendo a estímulos externos. Isto leva a que ao contrário do que acontece com outros anestésicos, os agentes dissociativos causem um aumento da circulação sanguínea no cérebro e um consequente aumento da pressão intracraniana. A nível do sistema cardiovascular, a cetamina exerce um efeito depressor que tende a ser contrariado pelo sistema nervoso simpático. Nos aparelhos respiratório, gastrointestinal e urinário a cetamina não aparenta causar grandes alterações. O mesmo acontece com sistema muscular onde esta não produz grande efeito de relaxamento, podendo até causar alguma rigidez e movimentos involuntários, pelo que a combinação com um  $\alpha_2$  adrenérgico pode ser muito benéfica. Para lá de tudo isso, a cetamina possui também um forte efeito analgésico. No entanto enquanto agente dissociativo, a recuperação de uma anestesia feita com recurso a este fármaco pode ser caracterizada pela presença de comportamentos anormais, ataxia e uma sensibilidade exagerada a estímulos exteriores. Outra particularidade da cetamina é a capacidade para atravessar a placenta, pelo que quando utilizada para a realização de partos pode levar a que as crias nasçam sob o efeito do anestésico (Berry, 2015).

Esta combinação de fármacos tem sido amplamente utilizada na indução de anestesia em animais selvagens com grandes resultados quer ao nível da eficácia como do relaxamento muscular. A par disso a possibilidade de reversão do efeito do  $\alpha_2$  adrenérgico é uma particularidade que pode ter bastante utilidade (Clarke, Trim & Hall, 2014). Entre as espécies em que a utilização desta combinação já foi reportada com sucesso incluem-se o javali (*Sus scrofa*), o glutão (*Gulo gulo*) e o lince euroasiático (*Lynx lynx*) (Fenati, Monaco & Guberti, 2008; Arnemo, Evans & Fahlman, 2011).

No seio do programa de conservação do lince ibérico, a esta combinação podem ser adicionados outros fármacos, dependendo do estado do animal e do procedimento a realizar

(GMSLI, 2014). Algumas dessas alterações ao protocolo base incluem, por exemplo, o suplemento com midazolam, que apesar de não ter um grande efeito anestésico, é muito útil na pré-medicação pela rapidez de atuação e forte efeito tranquilizante e de relaxamento muscular, sendo um fármaco muito útil como adição aos protocolos (Reves, Fragen, Vinik & Greenbalt, 1985; GMSLI, 2014). No caso de se pretender anestésiar animais com um maior grau de dor pode adicionar-se a esses três fármacos metadona. Num outro exemplo, se o animal a anestésiar sofrer de epilepsia deve evitar-se a utilização de cetamina, e como normalmente estes animais estão a ser medicados com fenobarbital sódico, a combinação de dexmedetomidina com o midazolam é suficiente para induzir uma sedação profunda. Nos animais anestesiados que vão ser sujeitos ao procedimento de electro ejaculação deve evitar-se utilizar o midazolam, utilizando no seu lugar o butorfanol, pois também tem um efeito analgésico, mas ao contrário do midazolam não causa relaxamento muscular pelo que diminui o risco de contaminação da amostra com urina. Nas anestésias de fêmeas gestantes deve ser feita uma pré-medicação com dexmedetomidina, cetamina e metadona em doses mais baixas para a sedação, sendo que a indução é feita depois, por volta dos 12 minutos, com a administração endovenosa de propofol. Em crias para produzir uma sedação leve basta apenas utilizar dexmedetomidina e midazolam, podendo acrescentar-se cetamina se for pretendida uma sedação mais prolongada. Para uma sedação profunda deve adicionar butorfanol em vez de cetamina no protocolo base. Se for necessário fazer uma intervenção cirúrgica na cria o protocolo anestésico passa pela utilização de metadona ou morfina em combinação com a dexmedetomidina e o midazolam. Para animais com doença renal crónica os protocolos envolvem os mesmos fármacos, mas com dosagens inferiores. As anestésias destes animais devem ser o mais breves possível, não devendo ultrapassar os quarenta minutos. Nestes animais os opióides devem ser evitados, só podendo ser utilizados em animais até à fase I e apenas com o intuito de retirar a cetamina do protocolo anestésico. Em todas a anestésias em que seja necessário manter a anestesia por mais tempo que aquele que a anestesia fixa dada inicialmente permite, a manutenção da anestesia deverá ser feita recorrendo ao isoflurano, nunca acima de 2%. A utilização deste deve ser controlada com muita atenção pois tem um efeito hipotensivo marcado. A par disso é preciso especial atenção à sua utilização em animais com doença renal crónica, onde não deve ser utilizado acima de 1% (GMSLI, 2014). Alguns outros anestésicos têm sido testados para fins científicos durante procedimentos de rotina, é o caso do sevoflurano, um anestésico volátil mais recente, maioritariamente utilizado em medicina humana e de animais de companhia. O estudo feito com este anestésico revelou que produz uma indução rápida após sedação com medetomidina e que permite uma anestesia tranquila e facilmente controlável (Gómez-Villamandos et al., 2007).

Nas translocações de lince em que seja necessário sedar o animal, a sedação pode ser feita com midazolam, sendo indispensável levar preparadas, no mínimo, uma dose de

dexmedetomidina, para administrar em casos de urgência, e uma dose de metadona, a utilizar no caso de o animal sofrer algum tipo de lesão grave (GMSLI, 2014).

#### **2.6.4. MANEIO DE UM ANIMAL ANESTESIADO**

No decorrer de uma anestesia existem três parâmetros fundamentais a monitorizar no animal anestesiado ao longo de todo o processo. Esses parâmetros são: a profundidade da anestesia, a função cardiovascular e respiratória e a temperatura corporal (Haskins, 2015). Durante a anestesia de um lince ibérico é aconselhável que os médicos veterinários dividam as tarefas (sendo que é obrigatória a presença de um mínimo de dois médicos veterinários), para que o processo seja o mais metódico e célere possível. Assim, um destes deverá ficar encarregue da anestesia e da sua monitorização, enquanto ao outro compete realizar todos os exames e colheitas necessárias (GMSLI, 2014).

A profundidade anestésica pode ser classificada através da sua divisão em diferentes estádios e planos. Progredindo a profundidade da anestesia do estágio I até ao estágio IV, sendo que o estágio III considerado o estágio de anestesia cirúrgica. O estágio III subdivide-se em quatro diferentes planos anestésicos, onde o primeiro plano é aquele em que a anestesia é mais superficial e o quarto aquele que caracteriza uma anestesia mais profunda. A avaliação precisa da profundidade anestésica em que se encontra o animal é fundamental para garantir que durante o procedimento cirúrgico o animal se encontra inconsciente, imóvel e livre de dor, sem que por outro lado o animal seja demasiado anestesiado, o que poderia causar depressão dos sistemas fisiológicos do animal e morte. Apesar de se encontrar diretamente ligada à quantidade de anestésico no sistema do animal, a profundidade anestésica é influenciada tanto pela intensidade dos estímulos externos exercidos no animal durante a anestesia como pela existência de outros fatores depressores do sistema nervoso central. A avaliação da profundidade da anestesia é feita através da observação de vários sinais, destacando-se entre eles, a resposta fisiológica a estímulos dolorosos, a presença de movimentos involuntários, as frequências cardíaca e respiratória, o tônus muscular, a posição do globo ocular e a presença de reflexos (Haskins, 2015). No caso do lince ibérico, uma vez que parte das anestésias são realizadas para exames de rotina e não envolvem procedimentos cirúrgicos, a profundidade anestésica é controlada sobretudo a partir da presença dos reflexos, palpebral, corneal, pupilar, dor superficial e dor profunda (GMSLI, 2014).

Para a avaliação da função cardíaca, a medição da frequência cardíaca e avaliação do ritmo são duas ferramentas indispensáveis, sendo que tanto a bradicardia como a taquicardia podem diminuir o débito cardíaco. Como tal a frequência cardíaca deve ser monitorizada de perto e casos de bradicardia, taquicardia ou arritmia devem ser tratados para garantir a estabilidade fisiológica do animal. No entanto, no caso da taquicardia é importante perceber se esta é primária ou uma resposta compensatória do organismo, pois nesse último caso, uma correção da taquicardia sem o tratamento das causas primárias pode causar uma

descompensação cardiovascular. A pressão arterial é outro dos parâmetros a utilizar para a avaliação da função cardíaca, sendo que uma pressão arterial muito reduzida pode por em causa a perfusão de diversos órgãos e picos de pressão arterial elevada podem causar edemas e hemorragias. Em ambos os casos o cérebro é um dos órgãos que se encontra mais vulnerável, sendo assim de grande importância a monitorização e controlo deste parâmetro dentro dos valores normais. Outro parâmetro importante a avaliar é a perfusão dos tecidos. Esta pode ser avaliada de forma simples através da cor das mucosas e do tempo de repleção capilar. Uma avaliação cardíaca mais detalhada pode ser efetuada através do recurso à ecocardiografia, onde podem ser avaliados parâmetros como o débito cardíaco e contratilidade do miocárdio (Haskins, 2015). No caso das anestésias a lince ibérico, a frequência cardíaca deverá ser medida através de um estetoscópio ou de um pulso-oxímetro, sendo que também devem ser avaliados o tempo de repleção capilar e a coloração das mucosas (GMSLI, 2014).

A função respiratória pode ser avaliada através da pressão parcial tanto do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como do oxigénio ( $\text{O}_2$ ). Ao nível arterial, a pressão parcial de dióxido de carbono ( $\text{PaCO}_2$ ) é um bom indicador da ventilação alveolar. Quando esta atinge valores muito elevados, entrando num quadro de hipoventilação, existe o risco de uma acidose metabólica, devendo assim ser iniciada ventilação assistida sobre o animal anestesiado para corrigir esta situação. A medição da  $\text{PaCO}_2$  pode ser feita de forma indireta através da medição da pressão parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{PCO}_2$ ) no ar exalado no fim da expiração, pois existe uma relação direta entre os dois valores. Esta técnica denominada capnometria tem como vantagem ser menos invasiva. A pressão arterial parcial de oxigénio ( $\text{PaO}_2$ ) mede a capacidade dos pulmões de passarem o ar da atmosfera para o sangue, qualquer perturbação nesse processo pode causar hipoxemia, podendo chegar a por em risco a vida do animal caso o seu valor desça demasiado. Já o fenómeno oposto é mais raro, resultando normalmente de um aumento artificial do oxigénio no ar inspirado. O oxigénio contido no plasma tende a ligar-se às moléculas de hemoglobina, deste modo existe uma relação direta entre a saturação de oxigénio na hemoglobina ( $\text{SO}_2$ ) e a  $\text{PaO}_2$ , podendo a  $\text{SO}_2$  ser usada como marcador para o estado de oxigenação do indivíduo. Isto é vantajoso uma vez que a  $\text{SO}_2$  pode ser medida com oxímetro de pulso através de um processo não invasivo. Já a frequência respiratória não é um tão bom indicador da função respiratória do indivíduo, uma vez que mesmo os seus valores normais têm uma grande variabilidade. No entanto, alterações no ritmo respiratório do indivíduo anestesiado devem ser vigiadas pois estas são normalmente indicativas de uma alteração no estado do paciente (Haskins, 2015). Durante as anestésias realizadas em lince ibérico, a respiração do indivíduo anestesiado deve ser vigiada a todo o momento através dos movimentos respiratórios e das oscilações do balão do circuito anestésico. Deve ser utilizado também um capnometro ligado ao tudo

endotraqueal, assim como um oxímetro de pulso que deverá ser colocado na orelha ou na língua (GMSLI, 2014).

No caso da temperatura, a importância da sua monitorização prende-se tanto com o risco associado à sua variação como com a facilidade com que essas variações podem ocorrer. Por um lado a hipotermia é uma situação frequente durante a anestesia devido a diminuição do metabolismo, atividade muscular e à depressão dos mecanismos de termorregulação, presentes no sistema nervoso central, secundários à indução de um estado anestésico. Em casos ligeiros a hipotermia não apresenta efeitos nefastos para a saúde do indivíduo, no entanto em situações de uma hipotermia mais acentuada podem verificar-se arritmias e o aquecimento artificial torna-se obrigatório. Porém, o maior perigo associado à hipotermia a nível anestésico, prende-se com a redução do metabolismo que lhe está associada. Esta redução do metabolismo implica que os fármacos administrados são eliminados mais lentamente, o que leva a que todas as dosagens de fármacos, incluindo os anestésicos, devam ser reduzidas para compensar esta situação. Quando esta correção não é feita, incorre-se no risco de causar no paciente uma sobredosagem anestésica que pode ser mortal. Já a hipertermia, também não está associada a efeitos negativos aquando de situações ligeiras, mas é causa de destruição celular em casos mais graves. Os malefícios da hipertermia estendem-se a todos os sistemas do indivíduo podendo levar à morte, devendo o paciente ser arrefecido recorrendo a todos os métodos possíveis (Haskins, 2015). Durante os episódios de captura de animais selvagens a hipertermia é uma das principais complicações que podem surgir, para minimizar o risco do seu aparecimento as capturas deveram ser breves e não devem ter lugar em dias quentes ou alturas quentes do dia (Caulkett & Arnemo, 2015). Durante a anestesia de um lince ibérico a temperatura deverá ser medida no máximo com um intervalo de dez minutos através da utilização de um termómetro digital (GMSLI, 2014).

No decorrer de uma anestesia em lince ibérico, após a indução é necessário que o médico responsável pela anestesia fique a vigiar o animal para acompanhar a evolução dos efeitos da anestesia. Toda a informação recolhida durante a anestesia será registada numa folha previamente preparada para o efeito. As primeiras informações a recolher são o tempo que demora a fazer-se sentir o efeito inicial da anestesia e o tempo até ao animal estar completamente anestesiado. Após a anestesia estar no seu pleno efeito o animal deverá ser pesado e depois transportado para o local onde se vão realizar todos os exames pretendidos. O local de anestesia não deverá ser nem demasiado quente nem demasiado frio e deve estar abrigado da incidência de luz solar direta para evitar alterações bruscas da temperatura corporal do lince. O primeiro procedimento a ser tomado é a cateterização do animal, para garantir a existência de uma via endovenosa disponível caso seja necessário administrar de urgência algum fármaco. A via deverá ser mantida aberta com a infusão de soro, que deverá ser Lactato de Ringer, exceto se houver indicação para a utilização de um

soro diferente. O soro deverá ser posto a correr com o auxílio de uma máquina de infusão contínua para que a velocidade possa ser mais facilmente controlada e garantir o aporte constante de fluidos ao animal independentemente da sua posição. Os olhos do lince devem ser protegidos com a aplicação de uma pomada oftálmica lubrificante para evitar a desidratação da córnea. Caso estejam sujos, os olhos devem ser previamente limpos com soro fisiológico. Em situações que se preveja uma anestesia com duração superior a trinta minutos, o segundo passo deverá ser a entubação endotraqueal do animal, para o caso de ser necessário manter a anestesia com o recurso a anestésicos voláteis.

Na monitorização da anestesia, é da maior importância manter registos de tudo, desde as doses dos fármacos até aos valores registados a cada monitorização. Esta informação pode dar-nos uma perspetiva temporal que de outra forma seria muito difícil de conseguir. No entanto é da responsabilidade do anestesta saber o que medir e como medir, um trabalho que depende tanto da experiência deste como do seu empenho. A monitorização anestésica deve ser realizada em intervalos regulares e composta por vários elementos com os quais o anestesta deve conseguir avaliar a profundidade da anestesia, a função cardíaca, a função respiratória, a perfusão e oxigenação dos tecidos e a temperatura corporal do animal (Moens & Coppens, 2007; Clarke, Trim & Hall, 2014; Haskins, 2015). Assim, durante a anestesia a um lince ibérico, o médico responsável pela anestesia deve a cada cinco minutos conduzir uma monitorização anestésica, onde deverá verificar a presença ou ausência dos reflexos palpebral, pupilar, corneal, de dor superficial e de dor profunda, assim como os valores dos parâmetros vitais (frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura, pressão arterial média, capnometria e saturação de oxigénio) e a sua evolução ao longo de todo o tempo de anestesia (GMSLI, 2014). Para fazer uma correta avaliação destes parâmetros é no entanto necessário saber quais os valores de referência a utilizar para o animal anestesiado. Uma vez que no caso do lince ibérico esta informação é muito reduzida, os registos de monitorização conseguidos em estudos que envolvem o manejo de animais anestesiados são da maior importância para a determinação dos valores a utilizar como referência (Gómez-Villamandos et al., 2007).

Durante o período da anestesia o médico que não está responsável pela monitorização do animal deverá conduzir um exame físico completo, devendo para isso ser o mais sistemático possível para que nada fique por examinar. Antes de iniciar o exame físico, devem ser tiradas fotografias de ambos os lados do animal, assim como do seu dorso, cauda e cabeça. Durante o exame é também importante que se verifique se o animal tem o *microchip* de identificação em funcionamento. Num exame físico sistemático deve ser incluída a pesquisa de lesões causadas pela captura, a avaliação do estado da pele, ouvidos, olhos, cavidade bucal e nariz, dos sistemas músculo-esquelético, respiratório, cardiovascular, urogenital e nervoso, exploração abdominal e dos nódulos linfáticos. Sempre que possível, o exame geral deve ser complementado com um exame radiológico e uma ultrassonografia

abdominal. A radiografia é sobretudo importante em casos de distócia e na pesquisa de traumatismos e lesões crônicas de artroses, mas permite também avaliar melhor os rins e algumas alterações metabólicas. A ultrassonografia pode fornecer informação importante acerca do estado do sistema urinário, em especial acerca do estado dos rins, e do sistema reprodutor das fêmeas (GMSLI, 2014).

A par do exame geral já descrito, o médico veterinário deverá fazer a recolha de medições biométricas e de várias amostras biológicas estabelecidas pelo programa. Das amostras recolhidas o sangue é das mais importantes, sendo utilizado para realização de hemogramas, análises bioquímicas e pesquisa de agentes infecciosos. As fezes podem também ser colhidas durante a anestesia, mas é preferível que se colham da instalação ou jaula onde o animal se encontrava. São também colhidos quaisquer parasitas externos para posterior identificação, amostras de pelo e de urina e zaragatoas (oral e retal). Na primeira vez que um animal é examinado deve também ser colhida uma biópsia de pele. Em situações mais específicas podem também ser colhidas outras amostras, por exemplo para o diagnóstico de tuberculose deverá ser colhida uma amostra de muco da sonda endotraqueal assim que esta seja removida. Para além das amostras destinadas a análises, sempre que possível devem também ser colhidas amostras para serem armazenadas num banco de recursos biológicos com o objetivo de poderem ser utilizadas no futuro para estudos retrospectivos (GMSLI, 2014).

## **2.7. VALORES DE REFERÊNCIA**

### **2.7.1. HEMOGRAMA E ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

O conhecimento dos valores de referência do hemograma e dos parâmetros bioquímicos de uma espécie é vital para a interpretação dessas mesmas análises feitas a indivíduos dessa mesma espécie. Assim, tendo em conta a escassa informação que existia a esse nível para o lince ibérico e a necessidade de fazer avaliações de rotina aos animais (em especial daqueles que compõem o programa de reprodução em cativeiro), tornou-se necessário realizar estudos em animais saudáveis para determinar os valores hematológicos considerados normais para a espécie. Para a determinação destes valores, é primeiramente necessário selecionar uma amostra populacional que seja significativa e saudável. Ao trabalhar com espécies selvagens, e especialmente com espécies em perigo de extinção, esta tarefa torna-se mais complicada pois é necessária uma grande amostra que não é fácil de obter. Idealmente deveriam conseguir-se amostras de cerca de cento e vinte animais saudáveis. É possível tentar estabelecer os mesmos valores com uma amostra menor, sendo que uma amostra com aproximadamente metade desse número de animais pode produzir bons resultados caso a distribuição dos dados siga uma curva de distribuição normal. Trabalhar com amostras mais pequenas que isso pode resultar na obtenção de dados com um fraco intervalo de confiança, que podem ser contraditórios com a observação clínica (Pastor et al., 2009).

Os valores obtidos em hemogramas e análises bioquímicas podem sofrer variações por diversos fatores, como falhas na colheita ou envio das amostras, diferenças de idade e de maturidade sexual e hemólise. Ao trabalhar com animais selvagens a estes acrescenta-se fatores como a disponibilidade de alimento, a densidade populacional, alterações sazonais, o *stress* causado pela captura, os fármacos utilizados e o tempo decorrido entre a sedação e a colheita da amostra (Pastor et al., 2009).

Numa tentativa de minimizar as variações nos dados no seu estudo para determinar os valores de referência de hemograma no lince ibérico, Pastor et al. (2009), separaram as amostras em grupos divididos por idade, sexo e proveniência (meio selvagem ou cativo) dos indivíduos. Os dados obtidos deste estudo foram concordantes com a informação já existente e demonstraram diferenças significativas nos parâmetros relacionados com os glóbulos vermelhos entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas apresentavam valores menores nestes. Este estudo identificou também diferenças entre grupos etários com as crias (animais com idade inferior a 9 meses) a apresentarem um maior número de linfócitos e os sub-adultos (animais com idade entre 9 e 24 meses) a revelarem contagens de eritrócitos superiores às dos restantes grupos. Entre os animais de cativo e os capturados do meio selvagem, notou-se que os animais de vida livre apresentavam contagens de glóbulos brancos muito superiores às observadas nos animais do programa *ex situ*, indicando que possivelmente sofrem um maior efeito do *stress* de captura (Pastor et al., 2009). Num estudo semelhante mas com o objetivo de estabelecer valores de referência para um painel de análises bioquímicas, os animais foram divididos segundo os mesmo grupos, sendo que apenas foram utilizadas amostras de animais que não demonstrassem nenhum sinal clínico de doença e cujos parâmetros vitais durante a anestesia não sofreram desvios do normal. O painel de análises deste estudo contou com vinte e uma análises diferentes, sendo que na sua maioria os valores obtidos foram semelhantes aos descritos para outras espécies de lince, gato doméstico e outras espécies de felinos. No entanto, à semelhança do que acontece noutros felinos selvagens, os valores de glucose no lince ibérico encontravam-se mais elevados que nos gatos domésticos, podendo esta situação estar ligada ao *stress* da captura. Também os níveis de ureia no lince se encontravam significativamente acima do descrito para o gato doméstico, sendo que estes aparentam aumentar com a idade apesar de as diferenças encontradas entre os grupos etários não serem significativas. A par disso a ureia encontrava-se mais elevada nas fêmeas do que nos machos, ao passo que nestes os níveis de fósforo eram superiores, diferindo estes achados da informação preexistente e deixando a porta aberta a mais investigação. Outra diferença detetada e concordante com o que acontece noutras espécies, é o aumento da creatinina com a idade, possivelmente relacionado com a maior massa muscular e maior frequência de glomerulonefrite em animais mais velhos. Os dados deste estudo permitiram assim estabelecer os valores bioquímicos de referência para o lince ibérico (García et al., 2009).



### 2.7.2. MORFOMETRIA

A morfometria é o estudo estatístico das formas e das suas variações numa espécie ou entre espécies (Adams, Rohlf & Slice, 2004). A análise das formas dos seres vivos pode ser muito útil, pois situações como doenças, ferimentos, neoplasias ou adaptações a um determinado ambiente podem conduzir a alterações nas dimensões e formas de estruturas anatómicas, podendo assim o seu estudo conduzir-nos ao entendimento das causas que afetam e modificam a forma dos seres vivos (Zelditch, Swiderski & Sheets, 2012).

No caso do lince ibérico os estudos morfométricos permitiram já encontrar diferenças de forma e tamanho entre os crânios dos animais das duas populações existentes. Os resultados deste estudo mostram que os machos da população de *Doñana* apresentavam dimensões menores em vários dos pontos do crânio utilizados na análise, podendo isto ser um resultado da diminuição da variabilidade genética dessa população (Pertoldi, García-Perea, Godoy, Delibes & Loeschcke, 2006). Assim, as medições morfométricas são uma parte integrante do exame físico de rotina realizado em todas as anestésias de lince ibérico, devendo os médicos intervenientes estar familiarizados com a sua recolha (GMSLI, 2014).

### 3. OBJETIVOS

Com o trabalho desenvolvido para a elaboração desta dissertação pretende-se:

Estabelecer os valores de referência de hemograma (contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração corpuscular média de hemoglobina, hemoglobina corpuscular média, contagem de leucócitos, leucograma em valores absolutos e em percentagem, contagem de plaquetas e reticulócitos) da população de lince ibérico (*Lynx pardinus*) residente no CNRLI assim como das crias nascidas nesse mesmo centro;

Estabelecer os valores de referência para as análises bioquímicas (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, gama glutamil transferase, albumina, colesterol, bilirrubina total, amilase pancreática, lipase, glucose, ureia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, creatinofosfoquinase, lactato desidrogenase, cálcio, cloretos, ferro, fósforo, magnésio, triglicéridos) da população de lince ibérico residente no CNRLI assim como das crias nascidas nesse mesmo centro;

Estabelecer os valores de referência para o proteínograma (sero-albumina, globulinas totais,  $\alpha 1$  globulina,  $\alpha 2$  globulina, beta globulina, gama globulina, em valores absolutos e percentagens e coeficiente sero-albumina/globulinas totais) da população de lince ibérico residente no CNRLI assim como das crias nascidas nesse mesmo centro;

Realizar uma análise estatística das medições morfométricas (comprimento da cabeça e corpo, comprimento da cauda, altura da cernelha, comprimento das barbas, comprimento da orelha, comprimento do tarso, perímetro torácico, perímetro do pescoço, comprimento do pincel e condição corporal) da população de lince ibérico residente no CNRLI assim como das crias nascidas nesse mesmo centro;

Comparar os dados obtidos nesta dissertação com os obtidos em estudos anteriores realizados no lince ibérico e noutras espécies aparentadas de felinos selvagens.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. AMOSTRA**

Para este estudo foram utilizadas 123 anestésias a 59 lince ibéricos. Todas as anestésias tiveram lugar no CNRLI e foram efetuadas a animais que no momento da anestesia se encontravam a habitar os cercados do CNRLI, num período de estudo compreendido entre 8 de Novembro de 2009 e 22 de Julho de 2015, respetivamente datas da primeira e última anestesia utilizadas no presente estudo. Diferentes anestésias ao mesmo animal, foram considerados acontecimentos diferentes. Na constituição dos grupos para a determinação dos valores de referência foram excluídos todos os animais que na altura da anestesia se encontravam com algum tipo de afeção

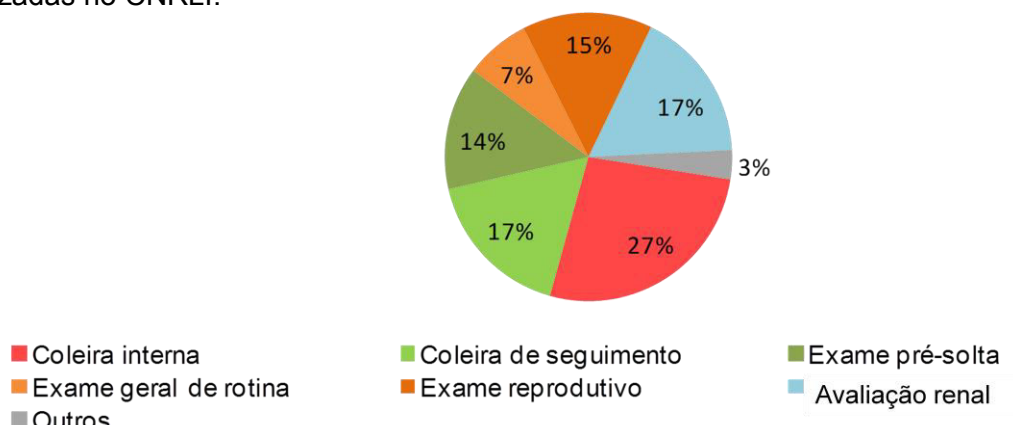
O trabalho desenvolvido nesta dissertação é um estudo retrospectivo, utilizando dados que são colhidos sistematicamente durante as anestésias realizadas no CNRLI. Assim, nenhuma anestesia teve como principal motivo a colheita de dados para o presente estudo.

O motivo pelo qual os animais foram anestesiados é variável (gráfico 1), sendo necessário referir que a maioria das anestésias são de rotina, previstas no programa de reprodução em cativeiro com vista a monitorizar o estado de saúde da população. No entanto, para melhor perceber a variedade de situações em que se procede à anestesia de um lince ibérico, apenas foram classificadas como anestésias gerais de rotina aquelas em que não houve outro motivo de relevância para a anestesia. Os exames reprodutivos, são realizados também inseridos nesta monitorização e poderiam ser classificados como anestésias gerais de rotina, mas para o efeito desta classificação foi considerado que o motivo principal da anestesia era o exame reprodutor sempre que foi realizado na presença de uma equipa externa especializada na avaliação reprodutiva. Foram também separados os exames pré-solta das anestésias para a colocação de coleira de seguimento, sendo que em todos os casos em que se colocou a coleira de seguimento foi também feito um exame que poderá ser considerado como exame pré-solta. Estes exames realizados a animais a preceder a sua libertação, têm como principal objectivo garantir que os animais que irão ser libertados estão num estado higio-sanitário compatível com a sua integração nas populações selvagens existentes.

Tendo em conta tudo isto, nas anestésias utilizadas para este trabalho o motivo de anestesia mais frequente foi a colocação de uma coleira de identificação interna (33 casos), seguindo-se como motivo principal para estas, em ordem decrescente de número de casos, a colocação de coleira de seguimento (21 casos), a avaliação renal (21 casos), o exame reprodutivo (18 casos), o exame pré-solta (17 casos) e o exame geral de rotina (9 casos). Os outros motivos para as anestésias utilizadas neste estudo decorreram de situações pontuais (dois casos de resolução de distócia, um caso de ovário-histerectomia [OVH] com colheita de embriões e um caso de eutanásia) No respeitante à eutanásia, é importante referir que para lá da discriminada nesta classificação, foi efetuada uma outra eutanásia

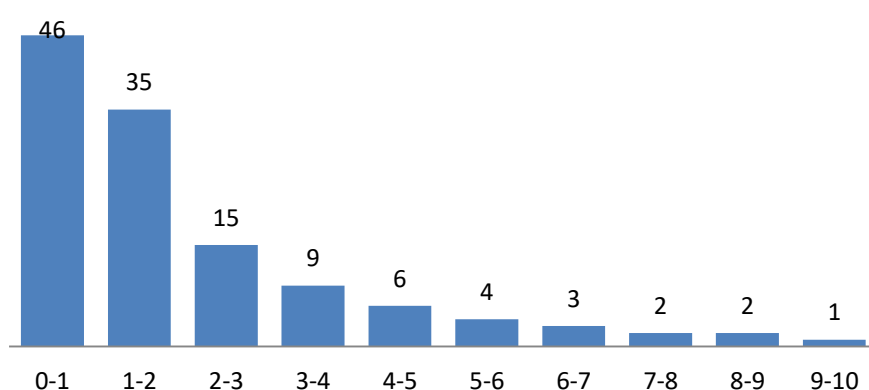
num período de 24 horas a seguir à anestesia, ambas a animais em fase terminal de doença renal crónica.

**Gráfico 1** - Distribuição de frequências dos motivos primários para as anestésias realizadas no CNRLI.



A idade dos animais anestesiados encontrava-se entre os 6 meses e os 10 anos de idade, sendo as intervenções anestésicas mais comuns em animais mais jovens (gráfico 2). Já o peso dos animais anestesiados variava entre 6,05kg e 16,20kg, sendo que o peso médio destes era 9,72kg.

**Gráfico 2** - Distribuição de frequências das idades (em anos) dos lince anestesiados no CNRLI.



Tanto a distribuição das frequências de idades como a distribuição dos pesos dos lince anestesiados (onde a média se encontra relativamente perto do valor mínimo), são descritas por curvas com um pico junto aos valores mais baixos. Esta situação é concordante com a grande percentagem de anestésias cujo motivo é a colocação de coleiras (quer sejam de identificação interna ou de seguimento) ou os exames pré-reintrodução. Isto pode ser explicado pelo facto de no decorrer de um ano completo, todas as crias nascidas esse ano serem anestesiadas pelo menos uma vez, ao passo que apenas alguns dos adultos são examinados, pois os exames de rotina são normalmente feitos com intervalos de 2 a 3 anos. Relativamente à geração dos animais anestesiados, o mais frequente foram as anestésias a animais F2 (74 casos), mas também foram efetuadas anestésias a animais F1 (28 casos) e

F0 ou fundadores (14 casos). Mais raras foram as anestésias realizadas a animais resultantes do cruzamento F1xF2 (7 casos).

Acerca da naturalidade dos animais anestesiados, a maioria das anestésias incidiu sobre animais nascidos no CNRLI (79 casos). As restantes anestésias foram realizadas em animais nascidos nos centros de reprodução de *El Acebuche* (25 casos) e *La Olivilla* (5 casos) ou no meio selvagem em *Andujar* (13 casos) e *Cardaña* (1 caso).

No que diz respeito ao sexo dos animais anestesiados, o número de anestésias realizadas é bastante semelhante entre machos (59 casos) e fêmeas (64 casos).

Ao nível da prevalência de doenças, a doença mais comum nos animais anestesiados é a DRC (15 casos), seguida de afeções músculo-esqueléticas (8 casos) e epilepsia (3 casos). Registou-se também o caso de uma anestesia realizada a um animal com lesão ocular.

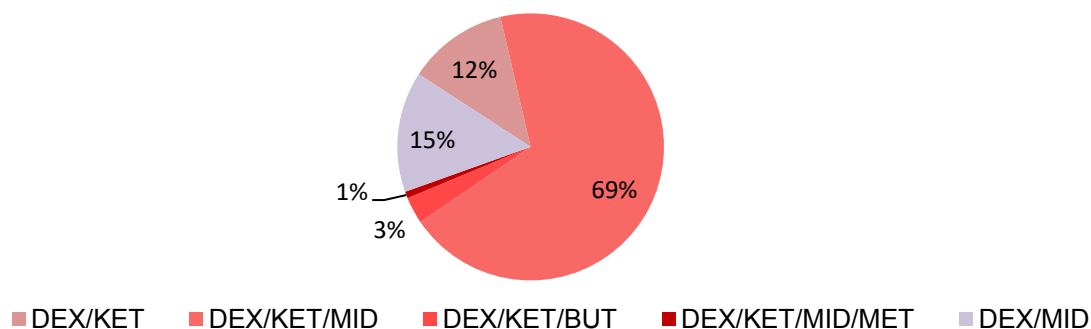
Apesar de previstas pelo protocolo, por razões que se prendem com as limitações de se trabalhar com animais selvagens inseridos num projeto de conservação *ex situ*, não se realizaram hemogramas, análises bioquímicas, proteinogramas e medições morfométricas em todas as anestésias. Da mesma forma nem sempre foi possível obter medições de todos os parâmetros destes testes analisados neste estudo. Assim o número da amostra para cada parâmetro específico varia consoante a quantidade de dados disponíveis e será apresentado juntamente com os restantes resultados.

#### **4.2. METODOLOGIA DE ANESTESIA E COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO**

A captura dos animais para as anestésias utilizadas nesta dissertação, foi na grande parte das ocasiões feita através da contenção física, sobretudo com o recurso à jaula-armadilha (115 casos), mas também com a utilização de uma rede ou caça mariposas (6 casos). A imobilização sem o recurso a contenção física foi utilizada apenas em 1 caso, tendo a indução anestésica sido realizada por meio de um disparo de zarabatana. Todos estes métodos de captura encontram-se dentro do estabelecido nos protocolos do programa (GMSLI, 2014).

O protocolo de indução anestésica utilizado foi variável dentro do que está previsto pelo programa (GMSLI, 2014) (gráfico 3), sendo que a combinação dexmedetomidina com cetamina (DEX/KET) foi a mais utilizada (105 casos). Das vezes em que esta combinação foi utilizada, em 15 casos foi utilizada sem recurso a mais nenhum fármaco injetável, em 4 casos foi suplementada com butorfanol (DEX/KET/BUT), em 85 casos foi adicionado a esta combinação o midazolan (DEX/KET/MID) e numa das anestésias adicionou-se também a estes fármacos a metadona (DEX/KET/MID/MET). Em 18 casos, a indução foi feita sem o recurso à cetamina, utilizando-se o midazolan para complementar a ação da dexmedetomidina (DEX/MID).

**Gráfico 3** - Distribuição de frequências dos protocolos de indução anestésica utilizados.



O entre o momento da indução e os primeiros efeitos anestésicos observáveis variou entre um minuto e dezassete segundos (01m17s) e os dezasseis minutos (16m00s) sendo que o tempo médio até o seu aparecimento foi de quatro minutos e trinta e dois segundos (04m32s).

As medições morfométricas foram realizadas com o recurso a uma fita métrica maleável graduada até ao milímetro, sendo que as medidas foram sempre registadas em centímetros com uma precisão de meio centímetro. As medições realizadas neste âmbito obedeceram aos protocolos estabelecidos pelo programa (GMSLI, 2014).

O sangue enviado para análise foi colhido, segundo o protocolo (GMSLI, 2014), das veias safena, cefálica ou jugular dependendo da situação. O sangue para análises bioquímicas e para proteinograma foram colhidos em tubos com heparina, enquanto as amostras para hemograma foram colhidas em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

#### **4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística dos dados realizou-se com recurso aos programas informáticos Microsoft Excel 2007<sup>®</sup> e R<sup>®</sup> (version 3.2.4 Revised, da The R Foundation for Statistical Computing<sup>®</sup>). Os gráficos elaborados para ilustrar as distribuições de frequências de motivos anestésicos, idades dos animais anestesiados e dos protocolos de indução utilizados, foram feitos com o programa Microsoft Excel, assim como as médias apresentadas para o peso dos animais e para o tempo que demoraram a surgir os primeiros efeitos da indução.

Para a análise dos dados de hemogramas, análises bioquímicas e proteinograma, foram apenas consideradas anestésias realizadas a animais saudáveis. Em seguida foram determinados os valores de referência para todos os valores, seguindo as recomendações para a determinação de intervalos de referência da *American Society for Veterinary Clinical Pathology* (ASVCP). O primeiro passo neste processo foi a eliminação de outliers que foi feita utilizando o método de Dixon, seguidamente foi determinada a normalidade da distribuição dos dados utilizando testes de *Shapiro-Wilk*. Após verificar a normalidade da

distribuição e tendo em conta o número de dados (N) disponível para cada parâmetro em estudo, foi aplicado o método apropriado para o cálculo do intervalo de referência para cada um desses parâmetros (Friedrichs et al, 2012). Assim, seguindo as recomendações da ASVCP, para cada parâmetro analisado, é apresentado o N, a média, a mediana, o intervalo de referência estabelecido, os valores mínimo e máximo, o número de outliers removidos, a caracterização da distribuição dos dados, o método aplicado para o cálculo do intervalo de referência e o histograma (sendo os histogramas apresentados em anexo).

Também segundo as normas da ASVCP, não são apresentados intervalos de referência para parâmetros com N entre 10 e 20, pois os seus limites seriam demasiado incertos se calculados com tão poucos dados. Nesses casos deveriam ser apresentados todos os valores por ordem crescente, juntamente com a média, a mediana e o histograma, no entanto para facilitar a apresentação dos dados, estes são apresentados em conjunto com os restantes dados, apenas com a média, a mediana e valores extremos. As tabelas de valores e os histogramas são por seu lado apresentados em anexo em conjunto com os histogramas para os restantes parâmetros (Friedrichs et al, 2012).

Nos casos em que o N é inferior a 10 as normas da ASVCP (Friedrichs et al, 2012) sugerem não apresentar quaisquer valores pois a representatividade destes enquanto valores de referência é muito reduzida por via da variação individual, no entanto estes resultados são apresentados no trabalho da mesma forma que a ASVCP recomenda casos em que o N está entre 10 e 20.

Neste trabalho os parâmetros analisados são os constantes nas análises de rotina dos lincos ibéricos anestesiados no CNRLI. Assim, no caso do hemograma foram analisados os parâmetros: contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), concentração corpuscular média de hemoglobina (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), contagem de leucócitos totais, contagem relativa (em percentagem) e absoluta de linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, contagem absoluta de plaquetas e contagem (relativa e absoluta) de reticulócitos.

Para as análises bioquímicas foram considerados os valores de: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, gama glutamil transferase (GGT), albumina, colesterol, bilirrubina total, amilase pancreática, lipase, glucose, ureia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, creatinofosfoquinase (CPK), lactato desidrogenase (LDH), cálcio, cloretos, ferro, fósforo, magnésio, triglicéridos

No proteínograma os valores tidos em conta foram: sero-albumina,  $\alpha$ 1 globulina,  $\alpha$ 2, globulina, beta globulina, gama globulina, tanto em valor absoluto como em percentagem e o quociente sero-albumina/globulinas totais (S-A/G-T).

Para a análise estatística dos dados de morfometrias, não foram excluídos quaisquer animais, sendo consideradas todas as anestésias em que se tenha recolhido pelo menos uma das medidas em análise. As medidas analisadas neste estudo são: comprimento da

cabeça e corpo (sem cauda), comprimento da cauda, altura na cernelha, comprimento das barbas, comprimento da orelha, comprimento do tarso, perímetro torácico, perímetro do pescoço e comprimento do pincel. Estas medidas são as que constam nos protocolos de exame físico de rotina durante a anestesia a um lince ibérico (GMSLI, 2014). A análise iniciou-se com uma verificação da normalidade da distribuição dos dados por meio de testes *Shapiro-Wilk*, sendo a restante análise conduzida de forma apropriada aos resultados obtidos nesses testes. Para cada medida morfométrica em análise foram pesquisadas diferenças entre machos e fêmeas. Para esta comparação foram utilizados testes T para as amostras independentes nos casos em que a distribuição dos dados foi considerada normal e testes *Mann-Whitney U* nos casos em que a distribuição foi considerada não normal. Para finalizar foi também elaborada uma tabela descritiva das diferentes medidas morfométricas para diferentes grupos etários, sendo apresentada para cada um destes um valor de tendência central e uma medida de dispersão.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. HEMOGRAMA

A análise estatística dos dados do hemograma revelou que nem todos os parâmetros apresentavam uma distribuição normal dos seus dados. Deste modo, o método pelo qual foi calculado o intervalo de referência (IR) variou em conformidade com a normalidade da distribuição. Para os parâmetros com uma distribuição normal ou gaussiana (G), foi utilizado o método paramétrico, enquanto nos parâmetros em que a distribuição foi considerada não normal/ não gaussiana (NG), foi aplicado o método robusto para a determinação do intervalo de referência. Os *outliers* foram removidos previamente utilizando o método de *Dixon*, sendo o número de *outliers* removidos (OR) apresentado com os restantes dados (Tabela 1).

Uma vez que o N era bastante reduzido e seguindo as normas da ASVCP, foi calculado o IR para 90% em vez de para 95%. Nos casos em que o limite inferior do IR se encontrava em valores negativos estes foram corrigidos para zero, uma vez que valores negativos nestes parâmetros não fazem sentido do ponto de vista biológico. Esta correção de valores foi apenas necessária em dois dos parâmetros avaliados no hemograma (contagem relativa de monócitos e contagem relativa de eosinófilos).

Nos casos em que o N se encontrava entre 10 e 20 não foi apresentado qualquer intervalo de referência. Esta situação verificou-se para as contagens diferenciais absolutas de monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Nestes casos, os dados são apresentados na Tabela 1 em conjunto com os restantes parâmetros, apenas com a média, a mediana e valores extremos, sendo apresentadas tabelas de valores no Anexo 2 e histogramas apresentados no Anexo 1 em conjunto com os histogramas para os restantes parâmetros.

No caso das contagens de reticulócitos (tanto absoluta como relativa) o N disponível era de apenas 3. Para estes casos é apresentada média, mediana e valores extremos, juntamente com os restantes parâmetros (Tabela 1), tabela com todos os valores obtidos (Anexo 2) e histograma (Anexo 1) como informação complementar aos restantes dados apresentados.

### 5.2. ANÁLISE BIOQUÍMICA

Na análise estatística dos diferentes parâmetros da análise bioquímica verificou-se, à semelhança do que aconteceu no hemograma, que nem todos os dados apresentavam uma distribuição normal, pelo que o método de cálculo do intervalo de referência foi mais uma vez ajustado a cada situação. Da mesma forma, os *outliers* foram removidos previamente segundo o método de *Dixon*, e os valores negativos foram substituídos por zero. Esta correção de valores para zero foi apenas necessária em quatro dos parâmetros bioquímicos em análise neste estudo (ácido úrico, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e alanina aminotransferase).

**Tabela 1** - Intervalos de referência para os diferentes parâmetros do hemograma.

	N	Dist.	OR	Média	Mediana	IR 90%	Mínimo	Máximo
Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{g}$ )	28	G	0	9.4	9.5	[8.0 - 10.8]	7.6	11.2
Hemoglobina (g/dL)	28	G	1	13.3	13.2	[11.3 - 15.3]	10.8	15.4
Hematócrito (%)	27	NG	1	40.8	42.1	[31.0 - 51.0]	32.0	49.0
VCM (fL)	25	G	3	44.2	43,7	[38.8 - 49.5]	39.5	53.6
CHCM (g/dL)	28	G	0	31.3	31.6	[24.9 - 37.7]	24,0	42.3
HCM (pg)	27	NG	1	14,1	14,3	[12.8 - 15.8]	11,7	15,4
Leucócitos ( $\times/\mu\text{L}$ )	28	G	0	8379	7900	[3308 – 13450]	3230	14150
Linfócitos (%)	28	G	0	21.9	22.0	[5.9 - 37.9]	2.0	47.0
Linfócitos ( $\times/\mu\text{L}$ )	20	G	0	1758	1638	[329 - 3188]	217	3225
Monócitos (%)	24	NG	3	1.3	1.0	[0.0* - 3.0]	0.0	3.0
Monócitos ( $\times/\mu\text{L}$ )	19	NG	0	109.7	85.0	-	0,0	384,0
Neutrófilos (%)	27	G	0	74.1	74.0	[56.3 - 91.9]	46.0	96.0
Neutrófilos ( $\times/\mu\text{L}$ )	19	G	0	6014	5761	-	2295	11214
Eosinófilos (%)	25	NG	2	1.8	2.0	[0.0* - 4.2]	0.0	5.0
Eosinófilos ( $\times/\mu\text{L}$ )	18	G	1	139	167	-	0	299
Basófilos (%)	27	NG	0	0,0	0,0	[0,0 - 0,0]	0,0	0,0
Basófilos ( $\times/\mu\text{L}$ )	19	NG	0	0,0	0,0	-	0,0	0,0
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	16	G	2	407	399	[256 - 558]	263	569
Reticulócitos (%)	3	G	0	0,3	0,3	-	0,2	0,4
Reticulócitos ( $\times/\mu\text{L}$ )	3	G	0	25353	23432	-	18198	34428

**Legenda:****N** - número de amostras;**Dist.** - tipo de distribuição;**G** - distribuição normal/gaussiana;**NG** - distribuição não normal/não gaussiana;**OR** - número de outliers removidos;**IR 90%** - intervalo de referência para 90% da população;

\* - valores em negativos substituídos por zero.

No que diz respeito ao cálculo do intervalo de referência, apenas um dos parâmetros incluídos nesta análise (a quantificação da lipase) apresentou um N entre 10 e 20. Para facilidade de interpretação, a sua média, mediana e valores extremos são apresentados na Tabela 2 juntamente com os restantes dados, sendo incluída também uma tabela com todos os valores obtidos por ordem crescente (Anexo 4).

Mais uma vez à semelhança do que foi feito para o hemograma, é apresentado também (no Anexo 3) o histograma para todos os parâmetros em estudo.

A Tabela 2 contém assim os valores de tendência central (média e mediana) e extremos para todos os parâmetros em análise, assim como o IR 90% sempre que este foi possível de calcular. Como informação complementar foi ainda incluída na tabela, o número de dados disponíveis, o tipo de distribuição dos dados e o número de *outliers* removidos para cada parâmetro em análise.

**Tabela 2** - Intervalos de referência para os diferentes parâmetros da análise bioquímica.

	N	Dist.	OR	Média	Mediana	IR 90%	Mínimo	Máximo
Ácido Úrico (mg/dL)	21	NG	0	0.31	0.22	[0.00* - 0.69]	0.05	0.92
Albumina (g/dL)	28	G	0	3.41	3.42	[2.95 - 3.88]	2.70	3.96
Fosfatase Alcalina (UI/L)	28	NG	0	54	42	[0* - 92]	30	119
Amilase Pancreática (UI/L)	28	G	0	1135	1172	[846 - 1424]	761	1429
Bilirrubina Total (mg/dL)	25	G	2	0.34	0.33	[0.23 - 0.45]	0.20	0.48
Cálcio (mg/dL)	27	G	0	10.1	10.2	[9.2 - 11.1]	9.3	11.3
CPK (UI/L)	25	NG	1	399	393	[100 - 639]	216	789
Cloretos (mmol/L)	27	NG	0	108	105	[89 - 121]	98	123
Colesterol (mg/dL)	26	NG	0	177	182	[66 - 292]	59	261
Creatinina (mg/dL)	28	G	0	1.86	1.80	[1.20 - 2.51]	1.19	2.63
Fósforo (mg/dL)	27	NG	0	5.30	5.17	[3.30 - 7.17]	4.00	7.55
GGT (UI/L)	22	NG	0	1.48	1.30	[0.00* - 3.96]	0.00	5.07
Glucose (mg/dL)	28	G	0	223	226	[138 - 308]	121	352
Ferro (µg/dL)	21	G	0	100.5	98.0	[39.1 - 161.9]	43.0	200.0
LDH (UI/L)	26	G	1	215	200	[93 - 338]	93	412
Lipase (UI/L)	19	G	1	18.9	18.1	-	12.5	24.7
Magnésio (mg/dL)	21	G	0	2.42	2.42	[1.97 - 2.87]	1.95	2.93
Proteínas Totais (g/dL)	28	G	0	6.62	6.54	[5.77 - 7.47]	5.48	8.10
AST (UI/L)	24	G	1	27.7	27.1	[11.8 - 43.6]	9.6	50.4
ALT (UI/L)	27	NG	0	44	31	[0* - 81]	20	109
Triglicéridos (mg/dL)	27	G	0	15.7	16.9	[8.1 - 23.2]	3.4	23.5
Ureia (mg/dL)	26	NG	0	58	63	[33 - 101]	25	81

**Legenda:****N** - número de amostras;**Dist.** - tipo de distribuição;**G** - distribuição normal/gaussiana;**NG** - distribuição não normal/não gaussiana;**OR** - número de outliers removidos;**IR 90%** - intervalo de referência para 90% da população;

\* - valores em negativos substituídos por zero.

**5.3. PROTEINOGRAMA**

A avaliação estatística dos dados recolhidos nos proteinograma revelou que em todos os parâmetros os dados apresentaram uma distribuição dita normal. Deste modo foi utilizado o método paramétrico para o cálculo do intervalo de referência sempre que este foi possível de calcular. Mais uma vez os *outliers* foram removidos segundo o método de *Dixon*, e o intervalo de referência calculado para 90% da população. Os intervalos de referência para os parâmetros do proteinograma são apresentados na Tabela 3, assim como a média, mediana, valores extremos, N disponível, tipo de distribuição e número de *outliers* removidos.

Não foram estabelecidos intervalos de referência para as quantificações relativas (em percentagem) das diferentes proteínas avaliadas no proteinograma (N entre 10 e 20). Assim, à semelhança do descrito anteriormente, o valor da média, mediana, mínimo e máximo foram incluídos na tabela de resultados (Tabela 3) para facilidade de compreensão dos dados, e no Anexo 6 foram colocadas as tabelas com todos os valores por ordem crescente. Também à semelhança do já descrito, o histograma para cada parâmetro foi incluído em anexo (Anexo 5).

**Tabela 3** - Intervalos de referência para os diferentes parâmetros do proteinograma.

	N	Dist.	OR	Média	Mediana	IR 90%	Mínimo	Máximo
Sero-albumina (%)	18	G	0	58.1	58.2	-	50.3	64.6
Sero-albumina (g/dL)	23	G	0	3.84	3.81	[3.25 - 4.44]	3.18	4.50
Alfa-1 globulina (%)	17	G	1	4.91	4.90	-	4.30	5.50
Alfa-1 globulina (g/dL)	22	G	1	0.321	0.320	[0.264 - 0.377]	0.260	0.400
Alfa-2 globulina (%)	18	G	0	12.5	11.4	-	8.2	18.7
Alfa-2 globulina (g/dL)	23	G	0	0.88	0.90	[0.49 - 1.27]	0.53	1.30
Beta globulina (%)	18	G	0	14.7	14.7	-	10.6	19.0
Beta globulina (g/dL)	23	G	0	0.85	0.87	[0.43 - 1.26]	0.40	1.27
Gama globulina (%)	18	G	0	9.76	9.65	-	6.60	14.40
Gama globulina (g/dL)	23	G	0	0.69	0.61	[0.34 - 1.04]	0.42	1.20
Quociente (S-A/G-T)	23	G	0	1.42	1.40	[1.06 - 1.79]	1.01	1.82

**Legenda:**

**N** - número de amostras;

**Dist.** - tipo de distribuição;

**G** - distribuição normal/gaussiana;

**NG** - distribuição não normal/não gaussiana;

**OR** - número de outliers removidos;

**IR 90%** - intervalo de referência para 90% da população;

#### 5.4. MORFOMETRIA

Para a análise estatística das medidas morfométricas recolhidas, os dados para as diferentes medidas foram inicialmente sujeitos a testes de normalidade. Estes revelaram que em apenas duas das medidas em estudo (altura na cernelha e perímetro torácico) a distribuição dos dados pôde ser considerada normal. Uma vez que não se pretende criar intervalos de referência para estes dados, e apenas fazer uma análise descritiva dos mesmos, não se procedeu à remoção de *outliers*. Na tabela 4 é apresentado para cada medida um valor de tendência central e uma medida de dispersão (média e desvio padrão nos casos em que a distribuição foi considerada normal, mediana e intervalo inter-quartis para as medidas em que a distribuição foi considerada não normal). A par disso faz-se também a comparação dos valores obtidos em cada parâmetro para machos e fêmeas. Para melhor perceber esta comparação, são apresentando os valores de tendência central e de dispersão para cada um dos grupos em estudo, assim como a classificação das diferenças encontradas. As diferenças encontradas foram classificadas entre significativas (S,  $p < 0.05$ )

ou não significativas (NS,  $p \geq 0,05$ ), através de testes de comparação de médias (em dados com distribuição normal) ou medianas (para os dados com distribuição não-normal).

Dentro das medidas em análise, apenas em três delas (comprimento das barbas, comprimentos dos pincéis e perímetro do pescoço), as diferenças encontradas foram consideradas não significativas.

**Tabela 4** - Análise descritiva da morfometria para machos e fêmeas.

	Dist.	Dif.	Machos			Fêmeas		
			N	V.T.C	Dispersão	N	V.T.C	Dispersão
Comprimento cabeça-corpo (cm)	NG	S	52	82.8	[77.8 - 85.6]	51	76.5	[72.1 - 81.0]
Comprimento cauda (cm)	NG	S	52	15.8	[14.0 - 16.1]	54	14.0	[13.0 - 15.0]
Altura cernelha (cm)	G	S	52	42.5	4.7	53	39.2	4.1
Comprimento barbas (cm)	NG	NS	26	6.3	[5.0 - 7.0]	34	6.0	[5.0 - 7.0]
Comprimento orelha (cm)	NG	S	51	7.0	[6.5 - 7.5]	55	7.0	[6.0 - 7.0]
Comprimento tarso (cm)	NG	S	52	19.0	[18.0 - 19.6]	56	18.0	[17.0 - 18.5]
Perímetro tórax (cm)	G	S	51	42.6	3.8	52	40.1	2.9
Perímetro pescoço (cm)	NG	NS	40	25.0	[23.5 - 27.0]	49	25.0	[23.0 - 27.0]
Comprimento pincéis (cm)	NG	NS	31	3.2	[3.0 - 4.0]	42	3.0	[3.0 - 4.0]

**Legenda:**

**N** - número de amostras;

**Dist.** - tipo de distribuição;

**G** - distribuição normal/gaussiana;

**NG** - distribuição não normal/não gaussiana;

**Dif.** - classificação das diferenças encontradas;

**S** - diferença significativa ( $p < 0,05$ );

**NS** - diferença não significativa ( $p \geq 0,05$ ).

**V.T.C.** - valor de tendência central (média/mediana)

Para complementar esta análise comparativa entre machos e fêmeas foi ainda elaborada uma tabela de análise descritiva das diferentes medidas morfométricas em diferentes grupos etários (Tabela 5). Ao contrário do que foi feito na análise por sexo, nesta análise por grupo etário não foi feita determinada a significância de eventuais diferenças encontradas. Deste modo, é apenas apresentada uma tabela com o número de dados disponíveis, um valor de tendência central e uma medida dispersão para cada um dos grupos etários em estudo.

Para esta análise por grupos etários, os dados foram separados em três categorias, crias (animais com menos de 1 ano de idade), sub-adultos (animais com idade compreendida entre 1 e 2 anos) e adultos (com idade superior a 2 anos).

À semelhança do descrito para a tabela anterior (Tabela 4), também nesta tabela (Tabela 5) os valores de tendência central e medidas de dispersão apresentados variam consoante a distribuição dos dados (média e desvio padrão para dados com distribuição normal, mediana e intervalo inter-quartis para os dados com distribuição não normal).

Nesta análise dos dados é possível observar que para quase todas as medidas em análise os valores de tendência central são tanto maiores quanto mais idade tem o grupo etário. No entanto, para três das medidas em estudo isto não se verificou. Na medição do comprimento da orelha a mediana é igual para sub-adultos e adultos, e nas medições do comprimento da cauda e do tarso, a mediana dos valores obtidos foi maior no grupo dos sub-adultos que dos adultos.

**Tabela 5** - Análise descritiva da morfometria para diferentes grupos etários.

	Dist.	Crias			Sub-Adultos			Adultos		
		N	V.T.C.	Dispersão	N	V.T.C.	Dispersão	N	V.T.C.	Dispersão
Comprimento cabeça-corpo (cm)	NG	41	73.0	[71.0 - 78.0]	34	80.5	[77.6 - 85.0]	28	85.3	[82.5 - 89.0]
Comprimento cauda (cm)	NG	42	14.0	[13.0 - 15.0]	34	16.0	[14.5 - 16.8]	30	15.0	[13.6 - 16.0]
Altura cernelha (cm)	G	42	37.6	3.2	34	41.7	2.9	29	44.4	5.1
Comprimento barbas (cm)	NG	23	5.0	[4.0 - 5.9]	24	6.5	[5.5 - 7.0]	13	7.5	[7.0 - 9.0]
Comprimento orelha (cm)	NG	41	6.5	[6.2 - 7.0]	34	7.0	[7.0 - 7.5]	31	7.0	[6.5 - 7.5]
Comprimento tarso (cm)	NG	42	17.8	[17.0 - 18.5]	34	19.0	[18.0 - 19.4]	32	18.5	[17.4 - 20.0]
Perímetro tórax (cm)	G	41	39.0	2.5	33	41.8	2.7	29	44.0	3.8
Perímetro pescoço (cm)	NG	41	24.0	[23.0 - 25.0]	27	24.5	[23.3 - 26.0]	21	28.0	[27.0 - 29.0]
Comprimento pinceis (cm)	NG	16	3.0	[2.5 - 3.0]	12	3.2	[3.0 - 4.0]	22	4.0	[4.0 - 5.0]

**Legenda:**

**N** - número de amostras;

**Dist.** - tipo de distribuição;

**G** - distribuição normal/gaussiana;

**NG** - distribuição não normal/não gaussiana;

**V.T.C.** - valor de tendência central (média/mediana)

## 6. DISCUSSÃO

Ao nível dos parâmetros incluídos no hemograma e análises bioquímicas, têm já sido encontradas algumas diferenças no lince ibérico entre machos e fêmeas, e entre animais de diferentes idades (García et al., 2009; Pastor et al., 2009; García et al., 2010; GMSLI, 2014). No entanto, neste estudo, devido ao reduzido N para cada grupo e ao facto de anestésias no mesmo animal serem contadas como eventos diferentes, não foi feita essa comparação pois os resultados não seriam tão robustos quanto desejado e poderiam encontrar-se alterados por flutuações individuais nos animais com um maior número de anestésias incluídas neste estudo.

### 6.1. HEMOGRAMA

Para uma discussão mais detalhada dos resultados do hemograma, esta vai ser dividida em partes, primeiro a parte referente ao eritrograma, e posteriormente os resultados obtidos no leucograma e por fim a discussão dos resultados referentes a plaquetas.

Ao nível do eritrograma (contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM, HCM) e dos reticulócitos, os valores obtidos não parecem diferir dos já determinados para esta espécie (Pastor et al., 2009; GMSLI, 2014) nem dos valores determinados para outras espécies de felinos selvagens do mesmo género (Fuller, Kerr & Karns, 1985; Moen, Rasmussen, Burdett & Pelican, 2010) e de géneros diferentes (Dunbar, Nol & Linda, 1997; Marco, Martínez, Pastor & Lavin, 2000; Fushuku et al., 2001) ou para felinos domésticos (Merck & Co., Inc., 2010).

No leucograma todos os valores determinados encontram-se dentro dos intervalos de referência para o gato doméstico, apenas os valores de tendência central da percentagem de neutrófilos se encontram acima da referência para os gatos domésticos (Merck & Co., Inc., 2010). Quando comparados com o já existente para esta espécie, os valores determinados neste estudo para o leucograma são coincidentes com os obtidos em estudos prévios com lince ibérico em cativeiro, sendo globalmente mais baixos do que os valores obtidos nesses estudos para lince em liberdade (Pastor et al., 2009; GMSLI, 2014). Os valores no leucograma deste estudo são também bastante semelhantes aos obtidos noutros estudos para felinos selvagens de vida livre do género *Lynx*, sendo apenas notória alguma diferença no respeitante às contagens de neutrófilos que foram menores no presente estudo (Fuller et al., 1985; Moen et al., 2010). Ao comparar os dados deste estudo aos obtidos em espécies de felinos selvagens pertencentes a outros géneros, apesar de os valores não serem muito diferentes, as contagens do leucograma neste estudo foram consistentemente mais baixas do que as obtidas nos estudos com outras espécies (Dunbar et al., 1997; Marco et al., 2000; Fushuku et al., 2001). Durante o evento de captura e a manipulação de felinos existe a possibilidade de que estes desenvolvam uma leucocitose mediada pela libertação de epinefrina (Merck & Co., Inc., 2010). Assim, o facto das contagens de leucócitos obtidas neste estudo serem na globalidade mais baixas que as obtidas em estudos semelhantes,

quer para esta mesma espécie quer para outras espécies de felinos selvagens, pode ser explicada pela longa permanência destes animais em cativeiro. Possivelmente porque o continuado estado de cativeiro e a adaptação destes animais a essa condição, leva a que os eventos de capturas causem nestes um grau de excitação menor que aquele que aconteceria a animais em liberdade numa situação idêntica. Esta diferença no leucograma entre animais de vida livre e animais de cativeiro foi já observada noutros estudos nesta espécie (Pastor et al., 2009; GMSLI, 2014).

Ao nível das contagens de plaquetas, os valores encontram-se dentro do considerado normal para o gato doméstico (Merck & Co., Inc., 2010), e são concordantes com os valores já existentes para esta espécie (Pastor et al., 2009; GMSLI, 2014) e para outras espécies de felinos (Dunbar et al., 1997).

## **6.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

A discussão dos resultados obtidos nesta parte do estudo será feita primariamente na comparação de todos os valores com os valores de referência para o gato doméstico, depois será apresentada a comparação, também de todos os valores em estudo com os obtidos em estudos semelhantes existentes já para esta espécie, sendo por fim feita a comparação com estudos existentes para outras espécies de felinos selvagens.

Quando comparados com os valores de referência para o gato doméstico (Sodikoff, 2001; Merck & Co., Inc., 2010; Cornell University, 2014) a grande parte dos resultados obtidos neste estudo encontra-se dentro do que seria de esperar num gato doméstico saudável. No entanto, os valores obtidos para a fosfatase alcalina, bilirrubina total, CPK, colesterol, glucose e LDH encontram-se ligeiramente acima do limite superior do intervalo de referência determinado para o gato doméstico (Sodikoff, 2001; Merck & Co., Inc., 2010; Cornell University, 2014).

Relativamente a estudos semelhantes já existentes para esta espécie, a comparação entre esses e os resultados obtidos neste trabalho mostra que os valores são na sua maioria coincidentes ou próximos dos limites obtidos em estudos prévios (García et al., 2009; García et al., 2010; GMSLI, 2014). No entanto, para o caso da CPK, da GGT, da LDH e da AST os valores obtidos neste estudo foram consideravelmente mais baixos que os previamente determinados para a espécie (García et al., 2009; García et al., 2010; GMSLI, 2014), sendo assim mais próximos dos valores considerados normais para o gato doméstico (Merck & Co., Inc., 2010).

Comparativamente a outras espécies de felinos selvagens do mesmo género, não se encontram diferenças entre os resultados deste estudo e os determinados para o lince vermelho (Moen et al., 2010), mas os valores de CPK e LDH são muito inferiores aos determinados para o lince euroasiático (Fuller et al., 1985). A comparação com outras espécies de felinos pertencentes a géneros diferentes revelou que não existem grandes diferenças entre os valores obtidos neste trabalho e os determinados para o gato-bravo



(*Felis silvestris*) (Marco et al., 2000). O valor da AST determinado foi mais baixo que o já reportado para outras espécies de felinos selvagens (Dunbar et al., 1997; Fushuku et al., 2001). A par disso, também o valor dos triglicéridos se apresenta menor nos lince deste estudo que o reportado para a pantera-da-flórida (*Puma concolor cougar*) em estudos prévios (Dunbar et al., 1997).

Relativamente ao valores de CPK, LDH e AST, aumentos destes têm sido várias vezes associados ao *stress* da captura em felinos selvagens (Marco et al., 2000; García et al., 2010). Deste modo, é possível que os valores desses parâmetros obtidos neste estudo para o lince ibérico, se encontrem a baixo dos valores já determinados para esta e outras espécies de felinos selvagens devido a um menor *stress* durante captura resultante do menor tempo de espera entre a captura e a indução da anestesia, de uma manipulação mais controlada e também de um menor tempo entre a indução e a colheita de sangue para análise. Do mesmo modo, é possível que os valores de CPK, LDH e glucose se encontrem acima dos valores determinados para o gato doméstico devido ao *stress* da captura, que apesar de menor não pode ser desprezado, e aos fármacos utilizados para a contenção química dos felinos (Marco et al., 2000; García et al., 2010).

Em relação aos valores determinados neste estudo para a fostase alcalina, bilirrubina total e colesterol, estes encontram-se acima dos limites de referência para o gato doméstico (Merck & Co., Inc., 2010), mas são concordantes com valores já obtidos para o lince ibérico (García et al., 2009; García et al., 2010; GMSLI, 2014). O aumento da fosfase alcalina no sangue está associada, no gato, à colestase, sendo uma enzima pouco sensível mas bastante específica para essa situação (Hall & German, 2007). Os valores para a bilirrubina total, apesar de estarem acima dos valores de referência para o gato doméstico, não se encontram altos o suficiente para serem considerados hiperbilirrubinémia (Hall & German, 2007) e não foi registado qualquer ocorrência de icterícia nos animais incluídos neste estudo. Ao nível do colesterol, o aumento dos valores deste está relacionado com várias doenças, sobretudo ao nível do aparelho digestivo, no entanto está também ligado ao tempo pós-prandial (Hall & German, 2007). Assim, é possível que as diferenças entre os valores obtidos neste estudo e os valores para gato doméstico sejam resultantes de uma variação normal entre espécies, de diferenças na dieta, do tempo de jejum (entre 24 e 48 horas) que precede a anestesia necessária para a colheita de sangue no caso do lince ibérico, ou outros factores (García et al., 2010).

No que diz respeito à GGT, valores elevados desta estão normalmente associados a colestase, no entanto, a existência de várias isoenzimas diminui a sua especificidade. (Hall & German, 2007). No caso do lince ibérico, é possível que os aumentos desta enzima registados para a espécie em estudos anteriores (García et al., 2009; García et al., 2010) sejam resultantes de uma variação fisiológica própria da espécie ou de uma alteração causada pelo jejum prévio à anestesia.

### **6.3. PROTEINOGRAMA**

Ao nível do proteinograma, os valores determinados neste estudo para o lince ibérico encontram-se dentro dos intervalos de referência para o gato doméstico (Taylor et al., 2010), sendo também semelhantes aos determinados em estudos prévios para esta espécie (GMSLI, 2014) e outras espécies selvagens do mesmo género (Fuller et al., 1985; Moen et al., 2010). Apesar disso, os valores de gama globulina determinados neste trabalho para o lince ibérico são inferiores aos relatados para outras espécies de felinos selvagens de outros géneros (Marco et al., 2000; Fushuku et al., 2001). No entanto, uma vez que os valores determinados nesses estudos também se encontram dentro dos intervalos de referência para o gato doméstico, é possível que estas diferenças não sejam significativas.

### **6.4. MORFOMETRIA**

A análise da morfometria dos lincos ibéricos revelou um dimorfismo sexual expresso pela diferença de tamanho na globalidade das medidas analisadas, sendo os machos consistentemente maiores que as fêmeas. Esta situação é compactuante com o que já se sabia para esta espécie, encontrando-se os valores determinados dentro do considerado normal para a espécie (GMSLI, 2014). Apenas em três medidas (comprimento de barbas, pincéis e perímetro do pescoço) não foram encontradas diferenças significativas de tamanho entre machos e fêmeas.

No respeitante à evolução das medidas por idades, como seria de esperar, na generalidade, as medidas recolhidas são progressivamente maiores com o avanço da idade. No entanto, verificou-se em duas das medidas (comprimento da orelha e do tarso) que a média em adultos era igual ou inferior à dos sub-adultos. Esta situação pode derivar de uma variabilidade nos indivíduos analisados, mas é também possível que resulte da pouca objectividade com que são recolhidas estas medidas, uma vez que não é completamente definida a forma de medição. Assim, é criado um certo grau de variabilidade pelo observador aquando da medição que pode afectar os resultados obtidos.

É também de referir que nos grupos etários crias e sub-adultos os lincos ainda se encontram em fase de crescimento. Deste modo, uma vez que os lincos nem sempre são capturados com a mesma idade, no intervalo de um ano que cada um dos grupos etários inclui existe uma grande variabilidade resultante do crescimento.

## 7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O lince ibérico é uma espécie que vive lado a lado com o risco de extinção e a luta para salvar esta espécie é uma batalha diária na qual todas as ferramentas são importantes. O conhecimento dos valores de referência das várias análises hematológicas é uma ferramenta crucial para a prática clínica ao trabalhar com esta espécie, tendo sido nesse sentido que este trabalho foi desenvolvido.

Os resultados deste trabalho são na sua maioria coincidentes com o que já se conhecia para o lince ibérico, e mostram que os valores de hemograma, análises bioquímicas e proteinograma são muito semelhantes aos determinados para o gato doméstico. Grande parte das diferenças encontradas entre os valores determinados neste estudo para o lince ibérico e o gato doméstico podem ser atribuídas ao *stress* associado ao evento da captura, pelo que seria ideal conseguir fazer a colheita de sangue para análise sem que houvesse essa variável a ter em consideração para conseguir determinar os reais valores de cada parâmetro. Uma vez que conseguir isso não é uma tarefa fácil, a análise clínica dos resultados destes testes deve ser sempre feita tendo em conta essas alterações. No entanto, parece que o estado de cativeiro tem influência no grau de alteração dos resultados causado pelo evento de captura, minimizando esse impacto. Este efeito do cativeiro nos resultados pode ser devido a uma habituação dos lincees aos tratadores, a um evento de captura mais célere com menor duração do tempo que separa o momento em que entre o animal é apanhado na jaula de captura e o momento da indução, pelo menor tempo que entre o momento da indução e o momento da colheita de sangue, pela ação de outros fatores não conhecidos ou pelo conjunto de todos estes. Dessa forma seria interessante estudar mais com maior detalhe o efeito do cativeiro e a sua interação com o *stress* associado ao evento de captura na forma como produzem alterações nas análises.

Outro problema encontrado durante a realização deste trabalho ao nível das análises em estudo, foi o reduzido número de casos utilizados. Mesmo recorrendo a análises realizadas ao longo de cinco anos no CNRLI, o número de análises realizadas em animais saudáveis acabou por ser reduzido. Isso não parece ter muita influência nos resultados, uma vez que eles são semelhantes ao que se conhece para o lince ibérico, mas sem dúvida que um número de análises superior poderia reforçar a robustez destes. Nesse sentido seria uma mais-valia a realização de um estudo semelhante a este, mas utilizando dados recolhidos em lincees de todos os centros de reprodução em funcionamento. Existindo essa coordenação seria possível a realização de um estudo mais robusto e que permitiria também a comparação de valores entre machos e fêmeas e a sua evolução com o avanço da idade dos lincees.

Ao nível dos estudos da morfometria não se conheciam resultados para as medidas analisadas neste estudo, pelo que neste trabalho são apresentadas apenas de forma descritiva. No entanto, seria interessante estabelecer tabelas de crescimento e fazer uma

comparação mais criteriosa destas e da sua evolução com a idade para machos e fêmeas em separado. Para isso era no entanto necessário que a metodologia de recolha das medidas fosse revista para dar menos espaço a variações subjectivas criadas pela ação de recolher a medida. Seria também ideal que os lince fossem capturados sempre com a mesma idade para este tipo de estudo. Uma vez que isso não é praticável seria necessário registar a idade dos lince com uma maior precisão, possivelmente em meses em vez de ser registada em anos. Isto iria diminuir o número de dados disponíveis para cada categoria de idade pelo que também neste sentido seria útil a realização de um estudo transversal a todos os centros de reprodução do lince ibérico.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Adams, D.C., Rohlf, F.J. & Slice, D.E. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71, 5-16.
- Álvares, F. (2003). *A Problemática dos Venenos na Conservação do Lobo e o seu Impacto na Biodiversidade dos Ecossistemas*. Relatório Técnico. Programa Antídoto – Portugal. Lisboa. 17pp.
- Alves, J.P.G. (2014). *Avaliação da resposta de Lince-ibérico (Lynx pardinus, Temminck 1827) à presença humana, face a diferentes métodos de preparação para reintrodução*. Dissertação de Mestrado de Biologia da Conservação. Lisboa: Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa.
- Antonevich, A.L., Naidenko, S., Bergara, J., Vázquez, E., Vázquez, A., López, J., Pardo, A., Rivas, A., Martínez, F. & Vargas, A. (2009). A comparative note on early sibling aggression in two related species: the Iberian lynx and the Eurasian lynx. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.157-163). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Arnemo, J.M., Evans, A. & Fahlman, A. (2011). *Biomedical Protocols for Free-ranging Brown Bears, Wolves, Wolverines and Lynx*. Acedido em Set. 22, 2015, disponível em: <http://bearproject.info/wp-content/uploads/2014/07/2011-Biomedical-Protocols-Carnivores.pdf>
- Arnemo, J.M., Evans, A.L., Fahlman, A. & Caulkett, N. (2014). Field Emergencies and Complications. In G. West, D. Heard & N. Caulkett (Eds.), *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*. (2nd ed.) (139-148). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Berry, S.H. (2015). Injectable Anesthetics. In K.A. Grimm, L.A. Lamont, W.J. Tranquilli, S.A. Greene & S.A. Robertson (Eds.), *Veterinary anaesthesia and analgesia*. (5th ed.). (pp.277-296). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Braun, B.C., Frank, A., Dehnhard, M., Voigt, C.C., Vargas, A., Göritz, F. & Jewgenow, K. (2009). Pregnancy diagnosis in urine of Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Theriogenology*, 71, 754-761.
- Braun, B.C., Vargas, A. & Jewgenow, K. (2012). The molecular detection of relaxin and its receptor RXFP1 in reproductive tissue of *Felis catus* and *Lynx pardinus* during pregnancy. *Reproduction*, 143, 399-410.
- Broadbelt, D.C., Flaherty, D. & Pettifer, G.R. (2015). Anesthetic Risk and Informed Consent. In K.A. Grimm, L.A. Lamont, W.J. Tranquilli, S.A. Greene & S.A. Robertson (Eds.), *Veterinary anaesthesia and analgesia*. (5th ed.). (pp.11-22). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Calzada, J., González, L.M., Guzmán, J.N., Heredia, B. (2009). A new Strategy for the Conservation of the Iberian Lynx. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.23-31). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Caulkett, N.A. & Arnemo, J.M. (2015). Comparative Anesthesia and Analgesia of Zoo Animals and Wildlife. In K.A. Grimm, L.A. Lamont, W.J. Tranquilli, S.A. Greene & S.A. Robertson (Eds.), *Veterinary anaesthesia and analgesia*. (5th ed.). (pp.764-776). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.

- Clarke, K.W., Trim, C.M. & Hall, L.W. (2014). *Veterinary Anaesthesia*. (11th ed.). Inglaterra: Saunders Elsevier.
- Conferência das nações unidas sobre o ambiente e desenvolvimento (1992). *Convenção sobre diversidade biológica*. Organização das Nações Unidas, Genebra.
- Cornell University. (2014). *Chemistry (Mod P) Reference Intervals*. Acedido a Jun. 11, 2016, disponível em: <https://ahdc.vet.cornell.edu/sects/clinpath/reference/chem.cfm>
- DGGMN (2010). *Censo de la población de lince ibérico 2010*. Acedido em Ago. 31, 2015, disponível em: <http://www.iberlince.eu/index.php/port/informacao-tecnica/mapas/informacoes-seminarios#.VeR9ISVViko>
- Dunbar, M.R., Nol, P. & Linda, S.B. (1997). Hematologic and serum biochemical reference intervals for Florida panthers. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(4), 783-789.
- Fenati, M., Monaco, A. & Guberti, V. (2008). Efficiency and safety of xylazine and tiletamine/zolazepam to immobilize captured wild boars (*Sus scrofa* L. 1758): analysis of field results. *European Journal of Wildlife Research*, 54, 269-274.
- Finkenwirth, C., Jewgenow, K., Meyer, H.H.D., Vargas, A. & Dehnhard, M. (2010). PGFM (13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2α</sub>) in pregnant and pseudo-pregnant Iberian lynx: A new noninvasive pregnancy marker for felid species. *Theriogenology*, 73, 530-540.
- Friedrichs, K.R., Harr, K.E., Freeman, K.P., Szladovits, B., Walton, R.M., Barnhart, K.F. & Blanco-Chavez, J. (2012) ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41, 441-453.
- Fuller, T.K., Kerr, K.D. & Karns, P.D. (1985). Hematology and serum chemistry of Bobcats in northcentral Minnesota. *Journal of Wildlife Diseases*, 21(1), 29-32.
- Fushuku, S., Yasuda, N., Matsumoto, M., Izawa, M., Doi, T., Sakaguchi, N. & Akuzawa, M. (2001). Reference Values a Limited Serological Survey for the Iriomote Cat in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(3), 653-656.
- Gallardo, F. (2007). Propuestas de manejo y enriquecimiento ambiental para la cría en cautividad del lince ibérico (*Lynx pardinus*). *Montes*, 90, 24-31.
- Gañan, N., Sestelo, A., Garde, J.J., Martínez, F., Vargas, A., Sánchez, I., Pérez-Aspa, M.J., López-Bao, J.V., Palomares, F., Gomendio, M. & Roldan, E.R.S. (2010). Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction*, 139, 275-285.
- García, I., Martínez, F., Pastor, J., Bach-Raich, E., Muñoz, A., Vargas, A. & Zorrila, I. (2009). Serum biochemical parameters for: the Iberian lynx (*Lynx pardinus*): reference values. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.199-208). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- García, I., Napp, S., Zorrila, I., Vargas, A., Pastor, J., Muñoz, A. & Martínez, F. (2010). Determination of serum biochemical reference intervals for the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *The Veterinary Journal*, 183, 201-204.
- Geraldes, H. (2016). *Wilder: Em sete anos foram reintroduzidos na natureza 170 lince-ibéricos*. Acedido em Jun. 18, 2016, disponível em: <http://www.wilder.pt/historias/em-sete-anos-foram-reintroduzidos-na-natureza-170-lince-ibericos/>

- Godoy, J.A., Casas-Marce, M., Fernández, J. (2009). Genetic issues in the implementation of Iberian Lynx Ex situ Conservation Programme. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.87-99). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Gómez-Villamandos, R.J., Velarde, J., Domínguez, J.M., Granados, M.M., Villalobos, C.M. & Galka, M.E. (2007). Sevoflurane anaesthesia in Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Record*, 160, 592-593.
- Göritz, F., Dehnhard, M., Hildebrandt, T.B., Naidenko, S.V., Vargas, A., Martínez, F., López-Bao, J.V., Palomares, F. & Jewgenow, K. (2009). Non Cat-Like Ovarian Cycle in the Eurasian and the Iberian Lynx – Ultrasonographical and Endocrinological Analysis. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 87-91.
- GAASLI (2004)a. *Manual Clínico del Lince Ibérico*. Acedido em Set. 19, 2015, disponível em: <http://www.lynxexsitu.es/seccion.php?secc=DOCUMENTOS&id=41>
- GAASLI (2004)b. *Manual de Crianza Artificial de Cachorros de Lince Ibérico*. Acedido em Ago. 3, 2015, disponível em: <http://www.lynxexsitu.es/seccion.php?secc=DOCUMENTOS&id=42>
- GMSLI (2014). *Manual sanitario del lince ibérico* (versão 2.1, Maio de 2014).
- Gusset, M. & Dick, G. (2012). Editorial, *WAZA Magazine*, vol 13, 1-2.
- Hall, E.J. & German, A.J. (2007). Laboratory evaluation of hepatic disease. In E. Villers & L. Blackwood (Eds) *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology* (2nd ed.). (184-206). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Haskins, S.C. (2015). Monitoring Anesthetized Patients. In K.A. Grimm, L.A. Lamont, W.J. Tranquilli, S.A. Greene & S.A. Robertson (Eds.), *Veterinary anaesthesia and analgesia*. (5th ed.). (pp.86-113). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Iberlince (2014)a. *Kodiak explora o seu novo território extremeño*. Acedido em Out. 16, 2015, disponível em: <http://www.iberlince.eu/index.php/port/sala-de-imprensa/noticia/newsarticle/79#.ViEJlexViko>
- Iberlince (2014)b. *Os lince libertados em Castilla La Mancha adaptam-se aos seus novos territórios*. Acedido em Out. 16, 2015, disponível em: <http://www.iberlince.eu/index.php/port/sala-de-imprensa/noticia/newsarticle/5#.ViEJDuxViko>
- Iberlince (2014)c. *IBERLINCE LIBERTA OITO NOVOS EXEMPLARES DE LINCE-IBÉRICO NOS MONTES DE TOLEDO*. Acedido em Out. 16, 2015, disponível em: <http://www.iberlince.eu/index.php/port/sala-de-imprensa/noticia/newsarticle/99#.ViEI4exViko>
- Iberlince (2014)d. *O lince-ibérico regressa a Portugal*. Acedido em Out. 16, 2015, disponível em: <http://www.iberlince.eu/index.php/port/sala-de-imprensa/noticia/newsarticle/126#.ViEIauxViko>
- Iberlince (2015). *La conservación del Lince Ibérico. Quince años de progressos*. Acedido em Set. 10, 2015, disponível em: <http://www.iberlince.eu/index.php/esp/component/news/newsarticle/379#.VfHwV9JVikp>

- Iberlince (2016). *Ecologia*. Acedido em Set. 20, 2016, disponível em: <http://www.iberlince.eu/index.php/port/lince-iberico#.V-Ddl62aWXc>
- ICNF (2014). *Pacto nacional para a conservação do lince ibérico*. Acedido em Jul. 27, 2015, disponível em: [http://areasprotegidas.icnf.pt/lince/images/docs/pacto\\_conservacao\\_lince.pdf](http://areasprotegidas.icnf.pt/lince/images/docs/pacto_conservacao_lince.pdf)
- ICNF (2015). Lince ibérico 2014-2015. Acedido em Set. 10, 2015, disponível em: <http://www.icnf.pt/portal/icnf/noticias/resource/lince-iberico/doc/Lince-iberico-2014-2015.pdf/view>
- IUCN (1998). *Guidelines for Re-Introductions*. Gland, Suíça e Cambridge, UK: IUCN. Acedido em Ago. 30, 2015, disponível em: <http://www.lynxexsitu.es/seccion.php?secc=DOCUMENTOS&id=39>
- Jiménez, M.A., Sánchez, B., García, P., Pérez, M.D., Carrillo, M.E., Moreno, F.J. & Peña, L. (2009) Diseases of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*): histopathological survey, lymphoid depletion, glomerulonephritis and related clinical findings. . In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.211-218). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Leus, K. & Lacy, R.C. (2009). Genetic and demographic management of conservation breeding programmes oriented towards reintroduction. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.75-84). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Mallinson, J.J.C. (2009). Conservation breeding programmes: an important ingredient for species survival. *Biodiversity and Conservation*, 4, 617-635.
- MAOTE (2014). Nota de Agenda de 27 de Junho de 2014. *Assinatura Pública do Pacto Nacional para a Conservação do Lince Ibérico em Portugal*. Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e Energia. Lisboa.
- Marco, I., Martínez, F., Pastor, J. & Lavin, S. (2000). Hematologic and serum chemistry values of the captive European wildcat. *Journal of wildlife diseases*, 36(3), 445-449.
- Martínez, F., López, G., Pastor, J., Zorrilla, I., Muñoz, A., García, I., Peña, L., Jiménez, M.A., Pérez, M.J., Molina, I., Aguilar, J.M., Quevedo, M.A., Meli, M.L., Lutz, H. & Vargas, A. (2009). Integrating health issues in the conservation of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.167-182). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Mata, M.A.S. (2012) Censo de las poblaciones andaluzas de lince ibérico año 2012. Acedido em Set. 9, 2015, disponível em: <http://www.iberlince.eu/index.php/port/informacao-tecnica/mapas/informacoes-seminarios#.VeR9ISVViko>
- Mata, M.A.S. (2014). Censo de las poblaciones andaluzas de lince ibérico año 2014. Acedido em Ago. 31, 2015, disponível em: <http://www.iberlince.eu/index.php/port/informacao-tecnica/mapas/informacoes-seminarios#.VeR9ISVViko>
- Mata, M.A.S. (2016). Censo de las poblaciones ibéricas de lince ibérico año 2015. Acedido em Jun. 18, 2016, disponível em : [http://www.iberlince.eu/images/docs/3\\_InformesLIFE/Informe\\_Censo\\_2015.pdf](http://www.iberlince.eu/images/docs/3_InformesLIFE/Informe_Censo_2015.pdf)



- Meli, M.L., Cattori, V., Martínez, F., López, G., Vargas, A., Simón, M.A., Zorrilla, I., Muñoz, A., Palomares, F., López-Bao, J.V., Pastor, J., Tandon, R., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. (2009). Threats to the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) by feline pathogens. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.221-233). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Merck & Co., Inc. (2010). *The Merck Veterinary Manual*. (10th ed.). Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc.
- Millán, J., Ruiz-Fons, F., Márquez, F.J., Viota, M., López-Bao, J.V. & Martín-Mateo, M.P. (2007). Ectoparasites of the endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* and sympatric wild and domestic carnivores in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 21, 248-254.
- Moen, R., Rasmussen, J.M., Burdett, C.L. & Pelican, K.M. (2010). Hematology, serum chemistry, and body mass of free-ranging Canada lynx in Minnesota. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(1), 13-22.
- Moens, Y. & Coppens, P. (2007). Patient monitoring and monitoring equipment. In C. Seymour & T. Duke-Novakowski (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Anaesthesia and Analgesia*. (2nd ed.). (pp.62-78). Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association
- Murrell, J.C. (2015). Adrenergic Agents. In K.A. Grimm, L.A. Lamont, W.J. Tranquilli, S.A. Greene & S.A. Robertson (Eds.), *Veterinary anaesthesia and analgesia*. (5th ed.). (pp.183-195). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Nowell, K. & Jackson, P. (1996). *Wild cats: status survey and conservation action plan*. Cambridge: International Union. for Conservation of Nature and Natural Resources.
- Palomares, F. (2009). Life history and ecology of the Iberian Lynx. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.5-11). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Pastor, J., Bach-Raich, E., Mesalles, M., García, I., Martínez, F., Vargas, A., Cuenca, R. & Lavín, S. (2009). Haematological reference values for the Iberian Lynx. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.185-196). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Pelican, K.M., Abaigar, T., Vargas, A., Rodríguez, J.M., Bergara, J., López, J., Vázquez, A., Chaparro, J.M., Brown, J. & Wildt, D.E. (2009). Unusual gonadal hormone profiles in the Iberian lynx as determined by fecal monitoring. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.341-351). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Pérez, J.M., Sanchez, I. & Palma, R.L. (2013). The dilemma of conserving parasites: the case of *Felicola (Loriscicola) isidoroi (Phthiraptera: Trichodectidae)* and its host, the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Insect Conservation and Diversity*, 6, 680-686.
- Pertoldi, C., García-Perea, R., Godoy, J.A., Delibes, M. & Loeschcke, V. (2006). Morphological consequences of range fragmentation and population decline on the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Zoology*, 268, 73-86.
- PCELI (2015). *Programa de Conservación Ex-situ del Lince Ibérico: Centro de cría*. Acedido em Jul. 30, 2015, disponível em: <http://www.lynxexsitu.es/programa.php?sec=centro>

- Rankin, D.C. (2015). Sedatives and Tranquilizers. In K.A. Grimm, L.A. Lamont, W.J. Tranquilli, S.A. Greene & S.A. Robertson (Eds.), *Veterinary anaesthesia and analgesia*. (5th ed.). (pp.196-206). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Requeijão, V.S.C. (2013). *Análise do comportamento predatório do lince-ibérico (Lynx pardinus) em cativeiro através do enriquecimento ambiental*. Dissertação de Mestrado em Antropologia, Área de especialização de Natureza e Conservação. Lisboa: Faculdade de Ciências Sociais e Humanas - Universidade Nova de Lisboa.
- Reves, J.G., Fragen, R.J., Vinik, H.R. & Greenblatt, D.J. (1985). Midazolam: pharmacology and uses. *Anesthesiology*, 62, 310-324.
- Rivas, A., Martínez, F., Sánchez, I., Aguilar, J.M., Quevedo, M.A., Bergara, J., Vázquez, E., Cuadrado, M. & Vargas, A. (2009). Hand-rearing of Iberian lynx cubs. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.109-124). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Rodríguez, A. & Calzada, J. (2015). *Lynx pardinus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. Acedido em Jun. 30, 2015, disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/12520/0>
- Roldan, E.R.S., Gomendio, M., Garde, J.J., Gañán, N., González, R., Crespo, C. & Arregui, L. (2009). A Genetic Resource Bank and assisted reproduction for the critically endangered Iberian lynx. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.305-314). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Sarmento, P., Cruz, J., Ferreira, C., Monterroso, P., Serra, R., Tarroso, P. & Negrões, N. (2009). Conservation status and Action Plan for the recovery of Iberian Lynx populations in Portugal. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.33-40). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Satyanarayan, S., Zade, S., Sitre, S. & Meshram, P. (2009). *A textbook on environmental studies*. New Deli: Allied Publishers Pvt. Ltd.
- Serra, R., Sarmento, P., Baeta, R., Simão, C. & Abreu, T. (2005). *Plano de Conservação ex situ para o lince-ibérico em Portugal: 1-80*. Lisboa, Instituto para a Conservação da Natureza (ICN). Acedido em Set. 13, 2016, disponível em: [http://lynx.uio.no/lynx/ibelynxco/04\\_library/4\\_2\\_strategies-&-action-plans/strategies-&-aps.htm](http://lynx.uio.no/lynx/ibelynxco/04_library/4_2_strategies-&-action-plans/strategies-&-aps.htm)
- Shoemaker, A.H., Maruska, E.J. & Rockwell, R. (1997). *Minimum Husbandry Guidelines for Mammals: Large Felids*. American Association of Zoos and Aquariums
- Simón, M.A., Cadenas, R., Gil-Sánchez, J.M., López-Parra, M., García, J., Fernández, L., Ruiz, G. & López, G. (2009). Conservation of free-ranging Iberian lynx (*Lynx pardinus*) populations in Andalusia. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.43-55). Madrid: Fundación Biodiversidad.

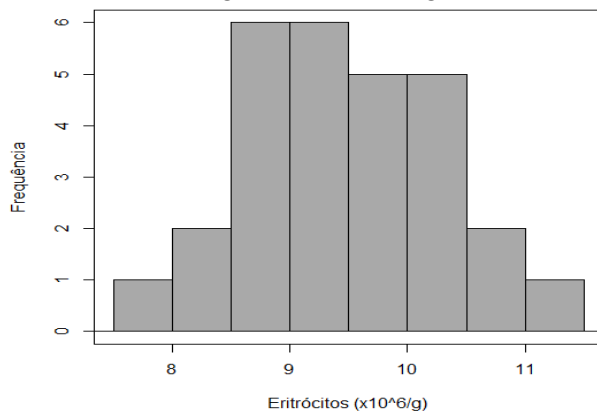
- Simón, M.A., Rojas, R.A., Díaz, J.A.B., Segura, J.F.B., Llano, R.C., García, S.L., Wamba, M.T.R., Segovia, M.P.D., Peña, L.F., Tena, J.A.F., Bartolomé, R.G., Santiago, J.G., Tardío, M.I.G., Alonso, G.G., Sánchez, J.M.G., Infante, A.M.G., Blanco, A.L., Parra, M.L., Zamora, G.L., Serrano, T.L., Sánchez, J.M.M., Cano, R.B.M., Castro, M.M., Domínguez, P.D., Marín, J.P., Siles, A.J.R., Hidalgo, E.M.R., Jiménez, J.R., Vergara, M.R., Muñoz, J.M.S., Arce, S.S., Piñeiro, R.S., Díaz, B.T. & Serrano, G.V. (2012). *Diez años de conservación del lince ibérico*. Sevilla: Consejería de Agricultura, Pesca e Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- Sodikoff, C.H. (2001). *Laboratory Profiles of Small Animal Diseases: A Guide to Laboratory Diagnosis*. (3rd ed.). St. Louis, Missouri: Mosby, Inc.
- Sunquist, F. & Sunquist, M. (2014). *The wild cat book*. Chicago and London: The University of Chicago Press.
- Taylor, S.S., Tappin, S.W., Dodkin, S.J., Papasouliotis, K., Casamian-Sorral, D. & Tasker, S. (2010). Serum protein electrophoresis in 155 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 643-653.
- Torres, J., García-Perea, R., Gisbert, J. & Feliu C. (1998). Helminth Fauna of the Iberian lynx, *Lynx pardinus*. *Journal of Helminthology*, 72, 221-226.
- Tranquilli, W.J. & Grimm, K.A. (2015) Introduction: Use, Definitions, History, Concepts, Classification and Considerations for Anesthesia and Analgesia. In K.A. Grimm, L.A. Lamont, W.J. Tranquilli, S.A. Greene & S.A. Robertson (Eds.), *Veterinary anaesthesia and analgesia*. (5th ed.). (pp.3-10). Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Turnhein, K. (2003). When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Experimental Gerontology*, 38, 843-853.
- Vargas, A., Martínez, F., Bergara, J., Klink, L.D., Rodríguez, J.M., Rodríguez, D., Rivas, A. (2005). *Manual de Manejo del Lince Ibérico en cautividad: Programa de Funcionamiento del Centro de Cría El Acebuche*. Acedido em Jul. 31, 2015, disponível em: <http://www.lynxexsitu.es/seccion.php?secc=DOCUMENTOS&id=38>
- Vargas, A., Martínez, F., Klink, L.D., Bergara, J., Rivas, A., Rodríguez, J.M., Rodríguez, D., Vázquez, A & Sánchez, I. (2006). Husbandry of Iberian Lynx in Captivity [versão eletrônica]. Pp. 75-88 in *Iberian Lynx Ex-situ Conservation Seminar Series: Book of Proceedings*. Fundación Biodiversidade, Sevilla & Doñana, Spain, Sept-Nov 2006. 200pp. Acedido em Jul. 31, 2015, disponível em: <http://www.lynxexsitu.es/seccion.php?secc=DOCUMENTOS&id=36>
- Vargas, A., Sánchez, I., Martínez, F., Rivas, A., Godoy, J.A., Roldan, E., Simón, M.A., Serra, R., Pérez, M.J., Sliwa, A., Delibes, M., Aymerich, M. & Breitenmoser, U. (2009). Interdisciplinary methods in the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*) Conservation Breeding Programme. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.57-71). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- Wildt, D.E., Howard, J.G., Pelican, K., Brown, J. & Pukazhenthi, B. (2009). Contributions of reproductive science to wild felid conservation. In A. Vargas, C. Breitenmoser & U. Breitenmoser (Eds.), *Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. (pp.293-302). Madrid: Fundación Biodiversidad.
- WAZA (2005). *Building a future for wildlife – the world zoo and aquarium conservation strategy*. Berna: World Association of Zoos and Aquariums

Zelditch, M.L., Swiderski, D.L. & Sheets, H.D. (2012). *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. (2nd ed.). London: Elsevier Inc.

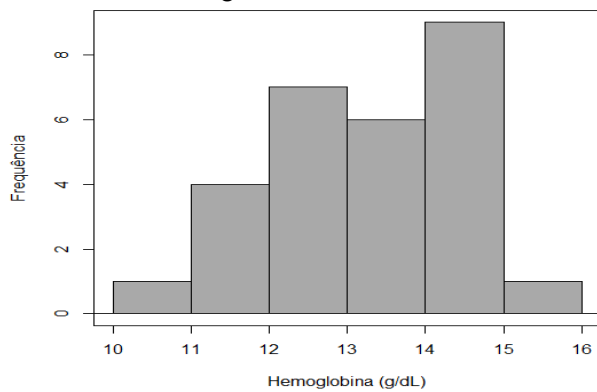
## 9. ANEXOS

### ANEXO 1. HISTOGRAMAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO HEMOGRAMA

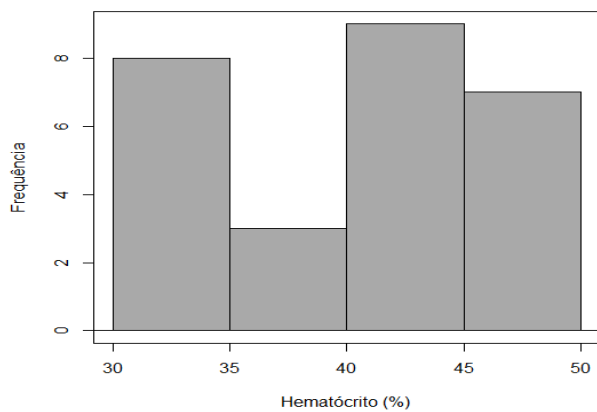
**Gráfico 4 - Histograma da contagem de eritrócitos.**



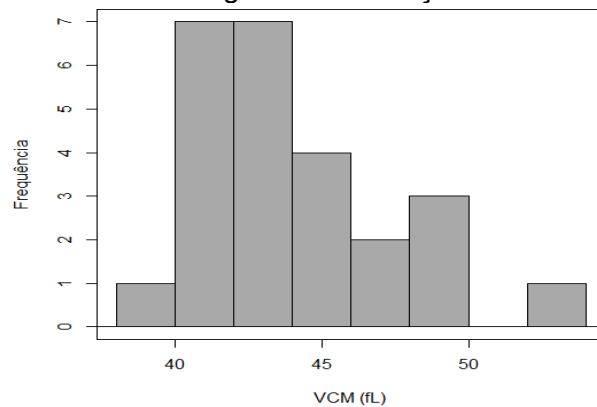
**Gráfico 5 - Histograma do doseamento de hemoglobina.**



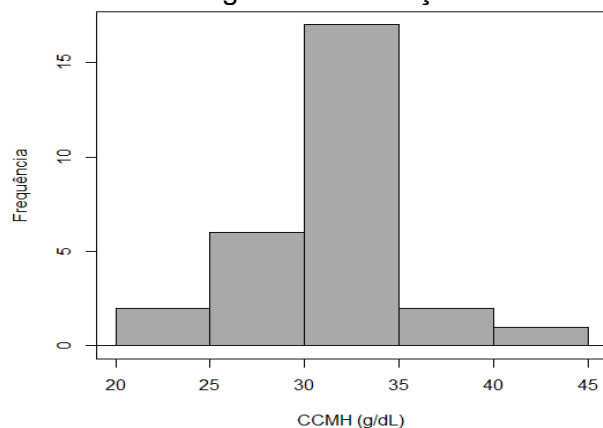
**Gráfico 6 - Histograma da medição de hematócrito.**



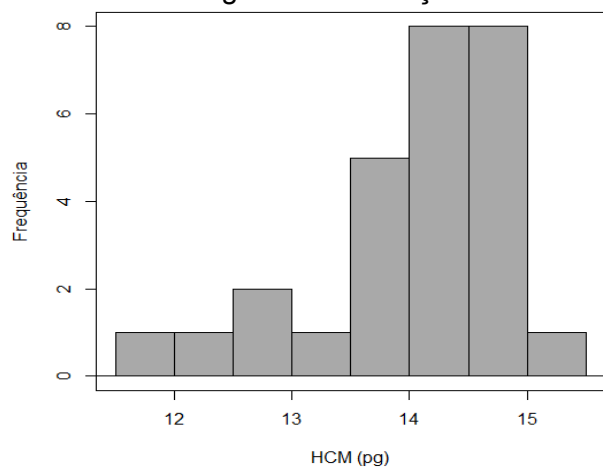
**Gráfico 7 - Histograma da medição do VCM.**



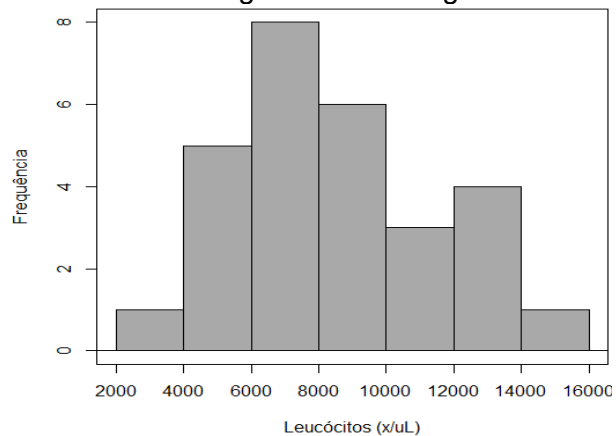
**Gráfico 8 - Histograma da medição da CHCM.**



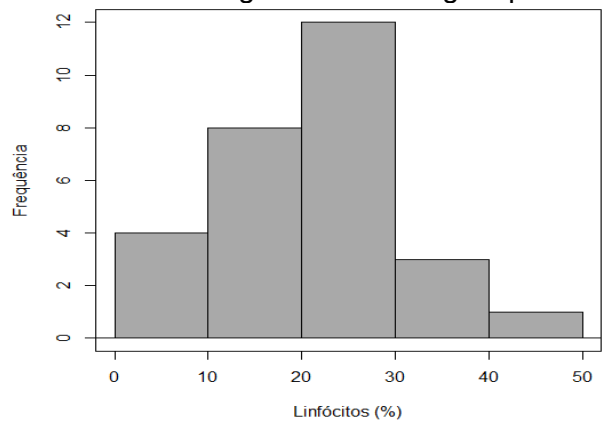
**Gráfico 9 - Histograma da medição da HCM.**



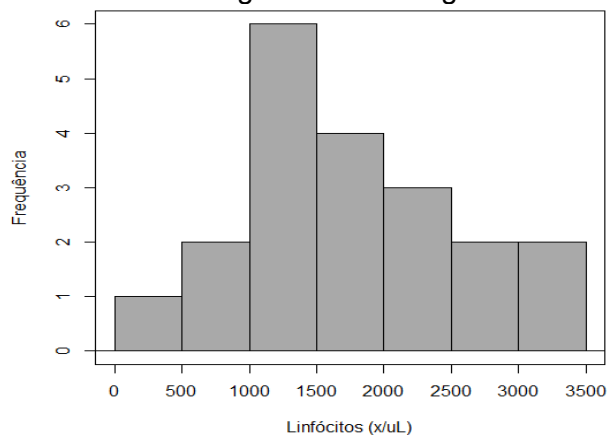
**Gráfico 10 - Histograma da contagem total de leucócitos.**



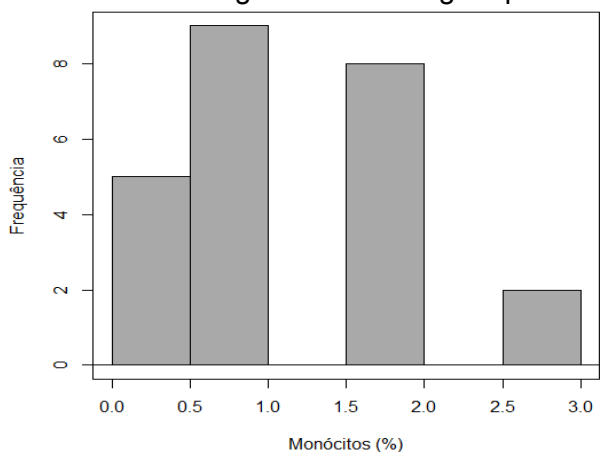
**Gráfico 11 - Histograma da contagem percentual de linfócitos.**



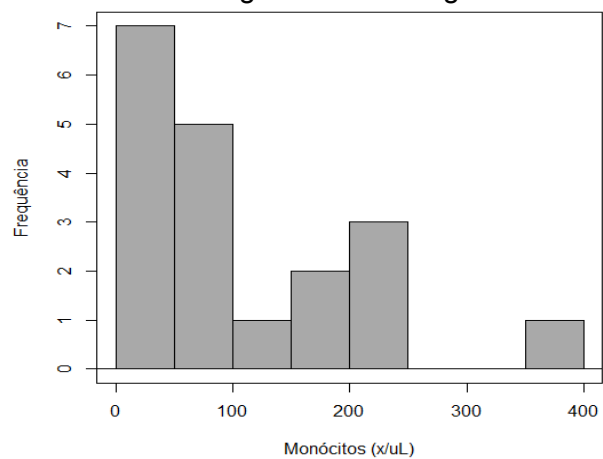
**Gráfico 12 - Histograma da contagem total de linfócitos.**



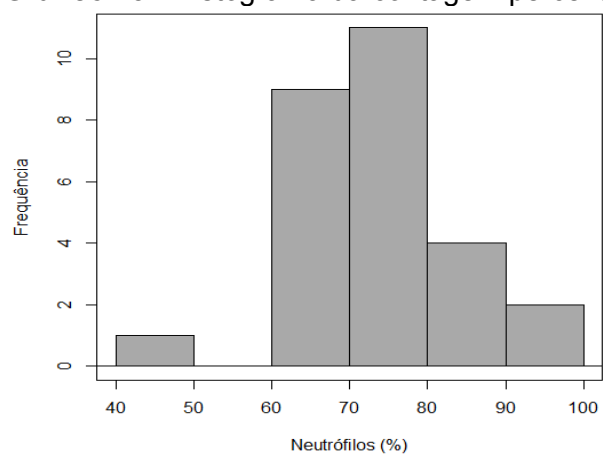
**Gráfico 13 - Histograma da contagem percentual de monócitos.**



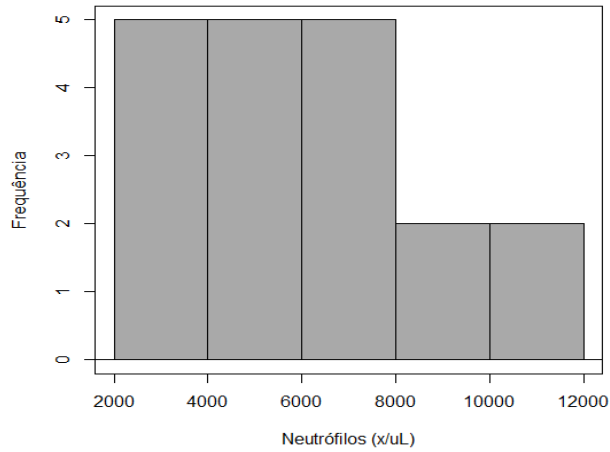
**Gráfico 14 - Histograma da contagem total de monócitos.**



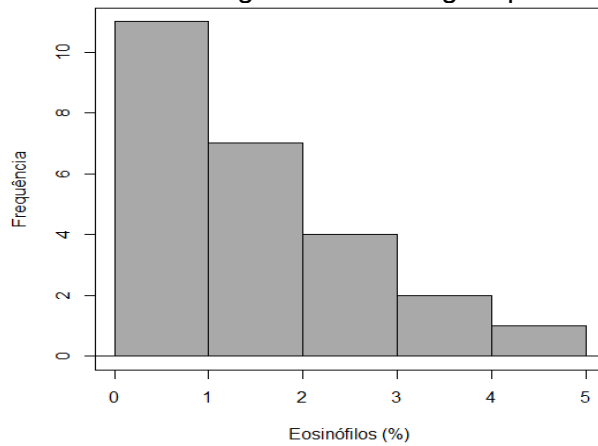
**Gráfico 15 - Histograma da contagem percentual de neutrófilos.**



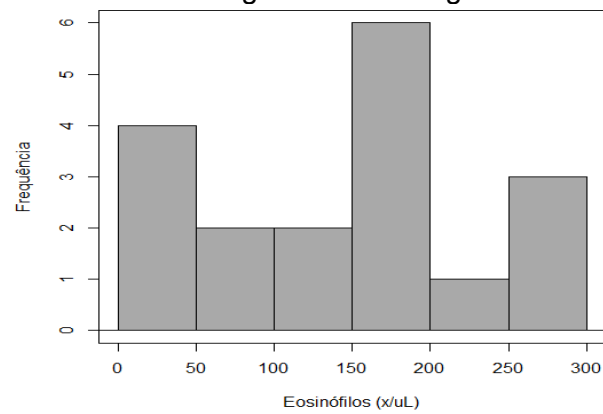
**Gráfico 16 - Histograma da contagem total de neutrófilos.**



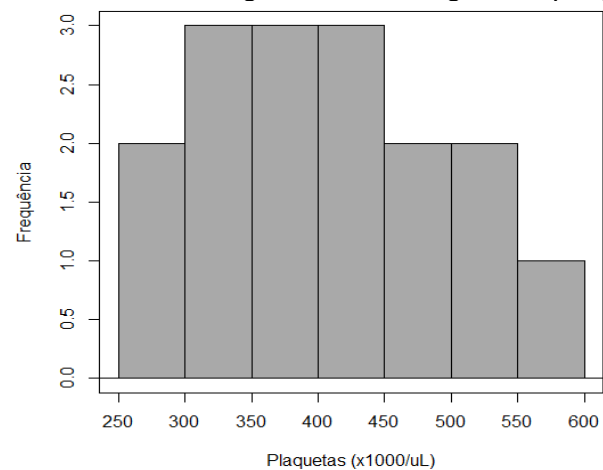
**Gráfico 17 - Histograma da contagem percentual de eosinófilos.**



**Gráfico 18 - Histograma da contagem total de eosinófilos.**



**Gráfico 19 - Histograma da contagem de plaquetas.**





## ANEXO 2. TABELAS DE VALORES DE PARÂMETROS DO HEMOGRAMA

**Tabela 6** - Valores crescentes da contagem total de monócitos (x/ $\mu$ L).

0
0
0
0
0
42
44
63
67
85
86
99
126
200
200
217
227
244
384

**Tabela 7** - Valores crescentes da contagem total de neutrófilos (x/ $\mu$ L).

2295
2326
2724
3064
3225
4277
4722
4725
5282
5761
6687
7398
7592
7795
7872
8085
8811
10406
11214

**Tabela 8** - Valores crescentes da contagem total de eosinófilos (x/ $\mu$ L).

0
0
0
0
65
76
105
150
164
170
172
189
192
197
210
252
252
299

**Tabela 9** - Valores crescentes da contagem total de basófilos (x/ $\mu$ L).

0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0
0

**Tabela 10** - Valores crescentes da contagem de plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ).

263
294
312
327
341
363
368
390
407
409
443
486
496
518
530
569

**Tabela 11** - Valores crescentes da contagem percentual de reticulócitos (%).

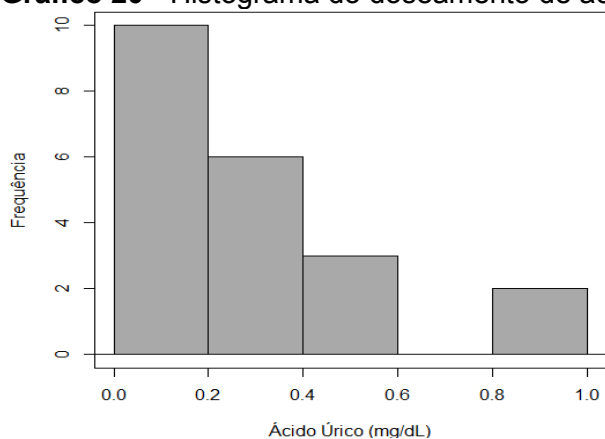
0,2
0,3
0,4

**Tabela 12** - Valores crescentes da contagem total de reticulócitos ( $\times/\mu\text{L}$ ).

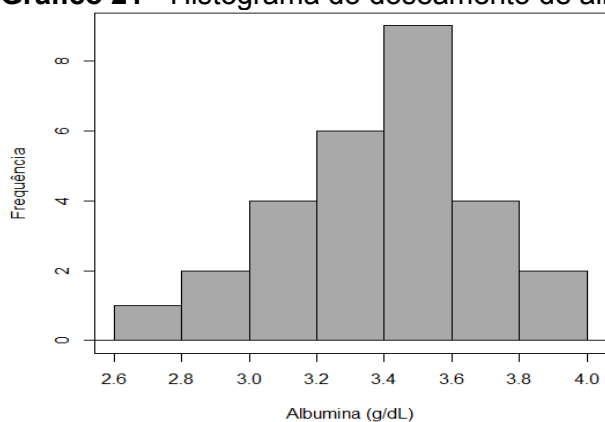
18198
23432
34428

### ANEXO 3. HISTOGRAMAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NA ANÁLISE BIOQUÍMICA

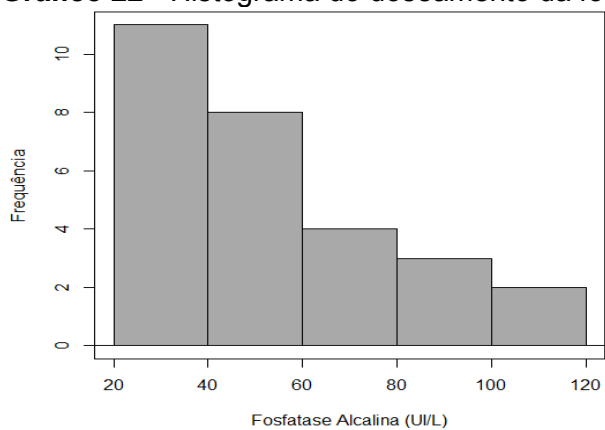
**Gráfico 20 - Histograma do doseamento de ácido úrico.**



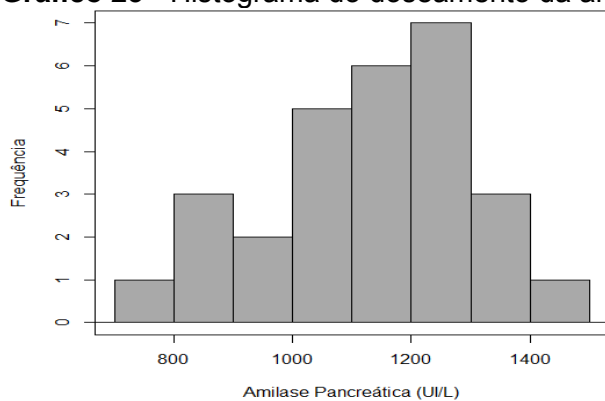
**Gráfico 21 - Histograma do doseamento de albumina.**



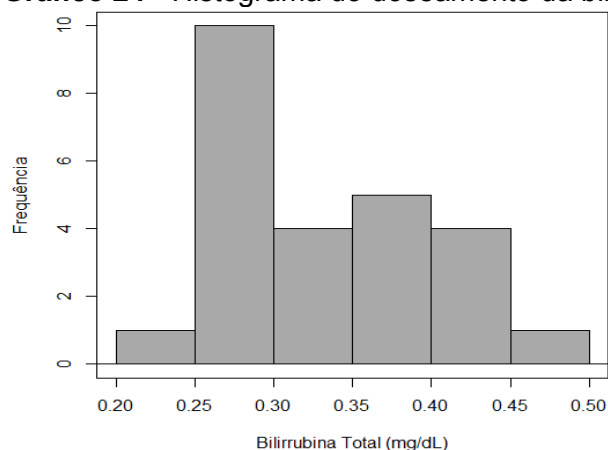
**Gráfico 22 - Histograma do doseamento da fosfatase alcalina.**



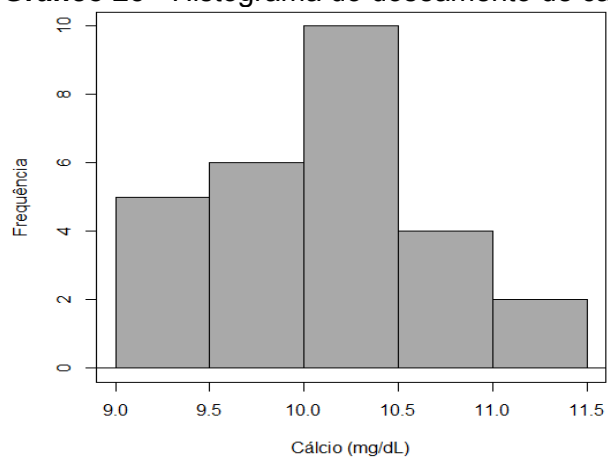
**Gráfico 23 - Histograma do doseamento da amilase pancreática.**



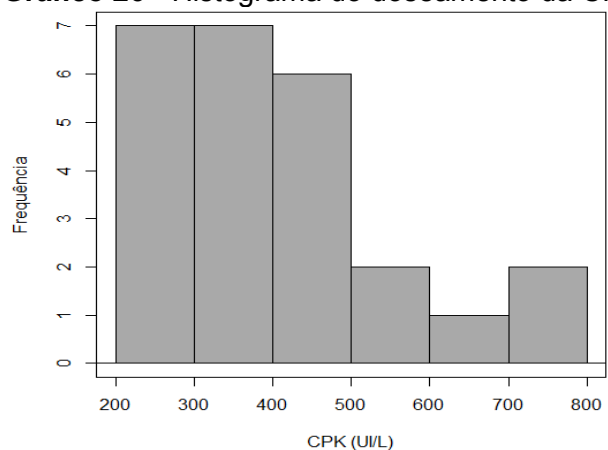
**Gráfico 24 - Histograma do doseamento da bilirrubina total.**



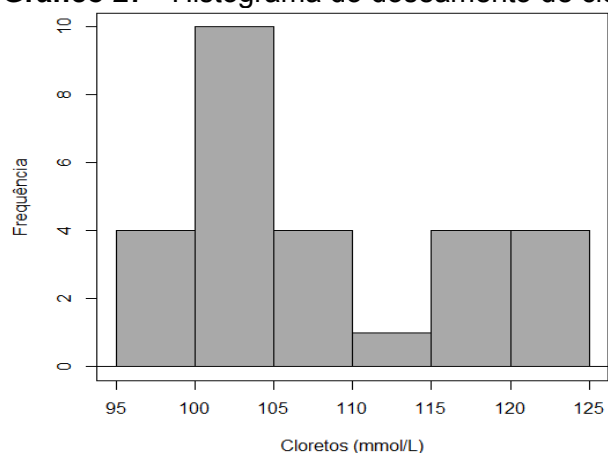
**Gráfico 25 - Histograma do doseamento de cálcio.**



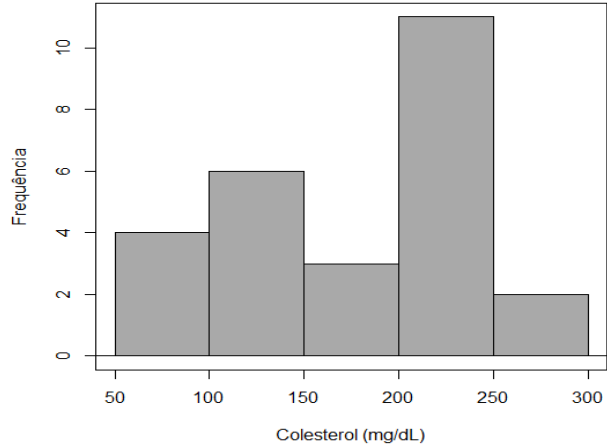
**Gráfico 26 - Histograma do doseamento da CPK.**



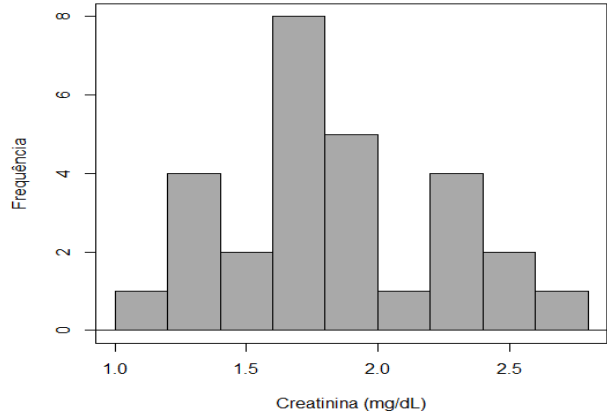
**Gráfico 27 - Histograma do doseamento de cloretos.**



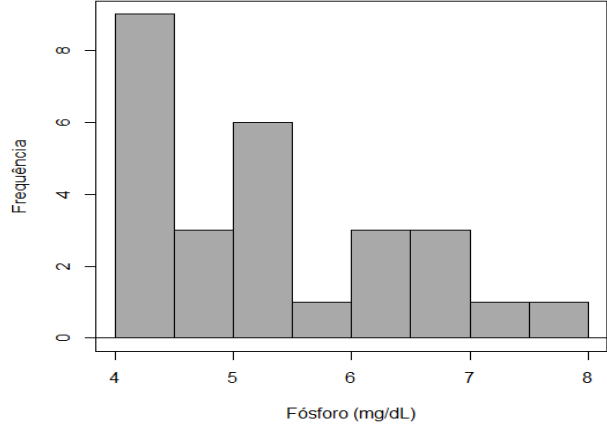
**Gráfico 28 - Histograma do doseamento de colesterol.**



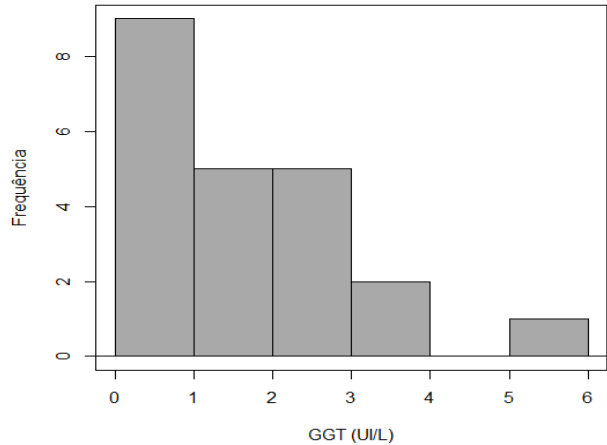
**Gráfico 29 - Histograma do doseamento de creatinina.**



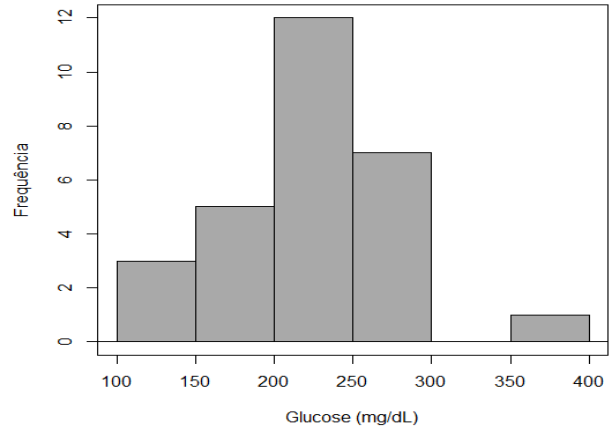
**Gráfico 30 - Histograma do doseamento do fósforo.**



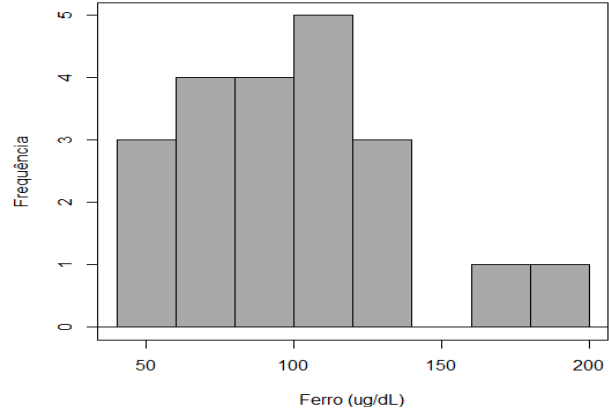
**Gráfico 31 - Histograma do doseamento da GGT.**



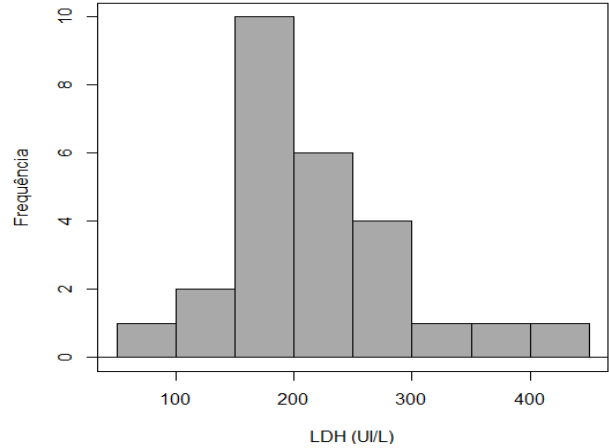
**Gráfico 32 - Histograma do doseamento da glucose.**



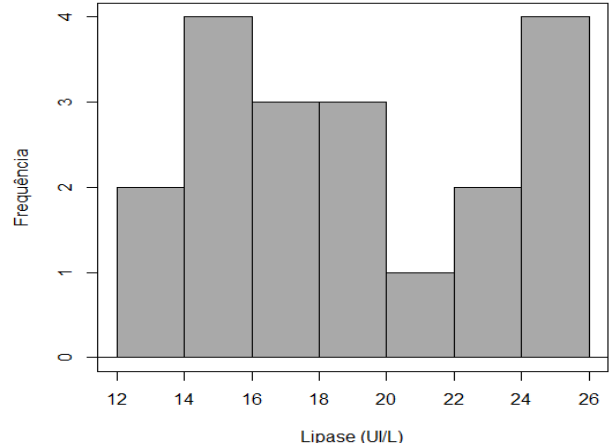
**Gráfico 33 - Histograma do doseamento do ferro.**



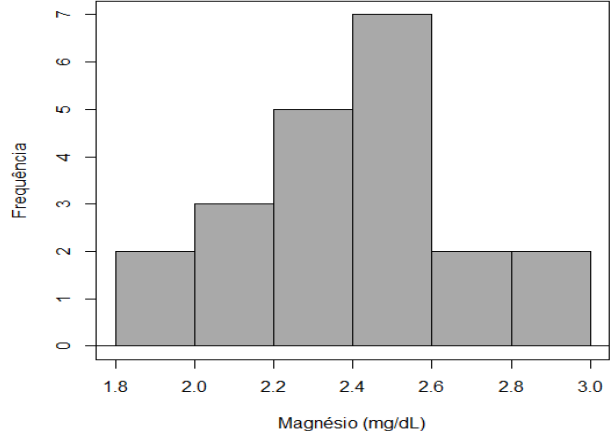
**Gráfico 34 - Histograma do doseamento de LDH.**



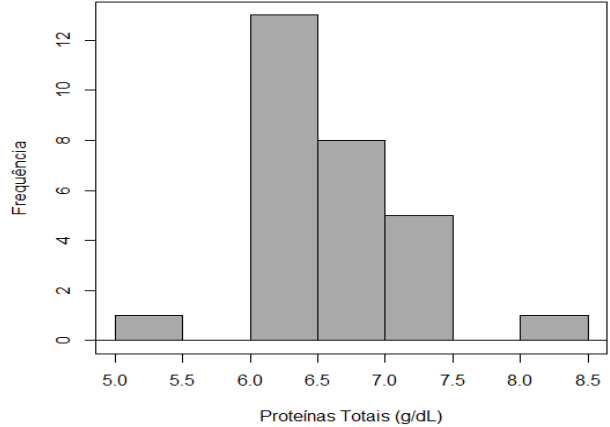
**Gráfico 35 - Histograma do doseamento da lipase.**



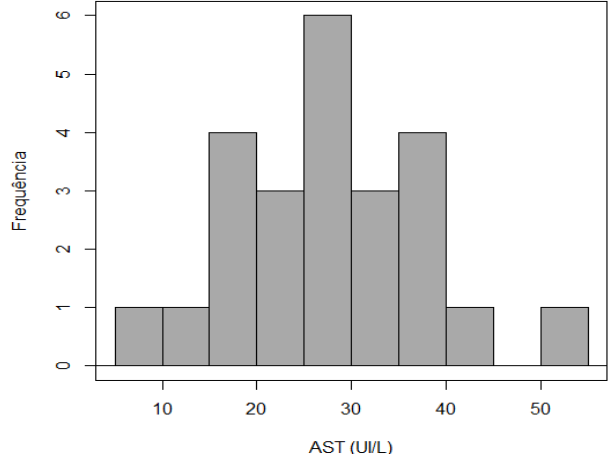
**Gráfico 36 - Histograma do doseamento de magnésio.**



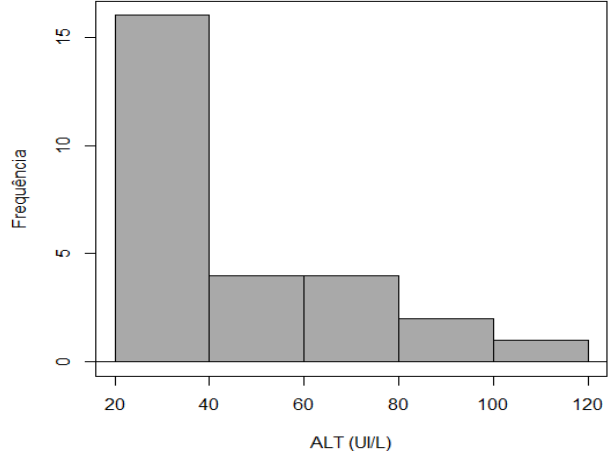
**Gráfico 37 - Histograma do doseamento de proteínas totais.**



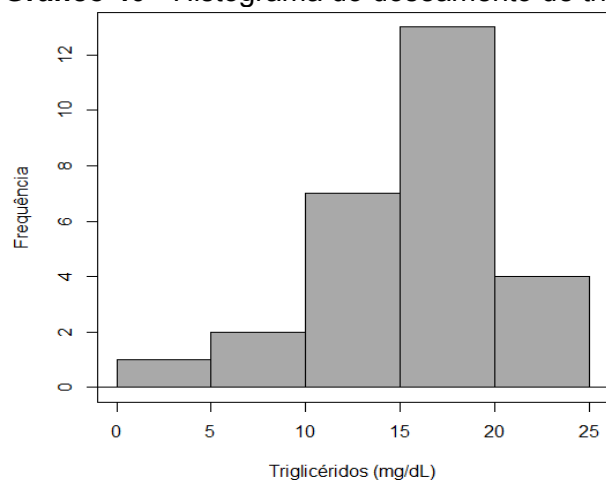
**Gráfico 38 - Histograma do doseamento de AST.**



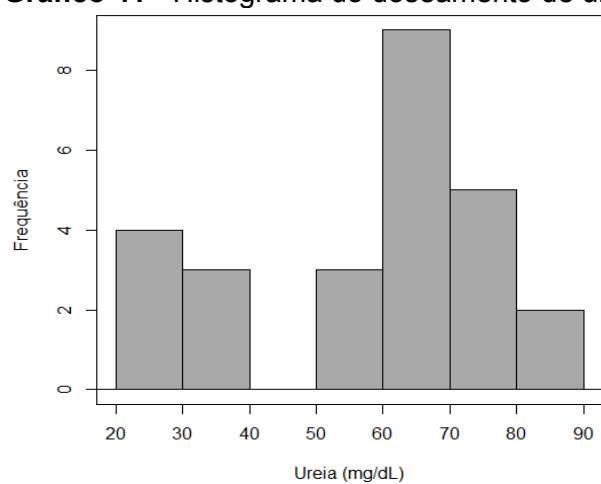
**Gráfico 39 - Histograma do doseamento de ALT.**



**Gráfico 40 - Histograma do doseamento de triglicéridos.**



**Gráfico 41 - Histograma do doseamento de ureia.**





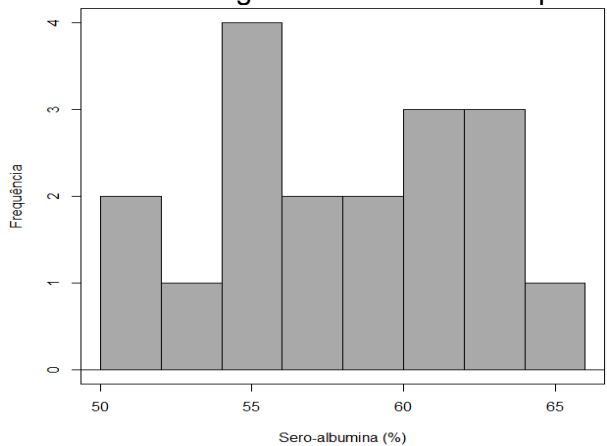
## ANEXO 4. TABELAS DE VALORES DE PARÂMETROS DA ANÁLISE BIOQUÍMICA

**Tabela 13** - Valores crescentes do doseamento da Lipase (UI/L).

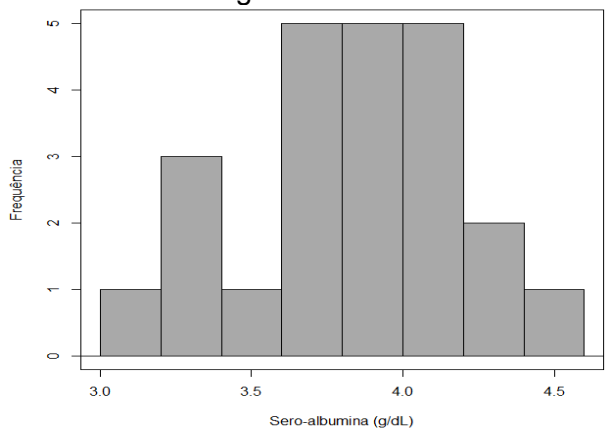
12,5
13,0
15,0
15,4
15,9
15,9
16,6
16,7
17,9
18,1
18,2
19,0
21,7
22,4
23,5
24,1
24,1
24,5
24,7

**ANEXO 5. HISTOGRAMAS DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO PROTEINOGRAMA**

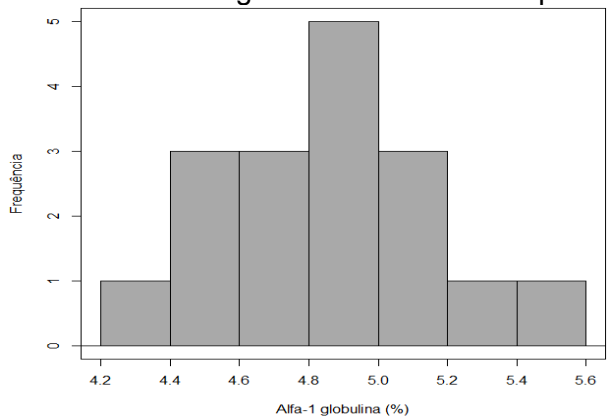
**Gráfico 42 - Histograma do doseamento percentual de sero-albumina.**



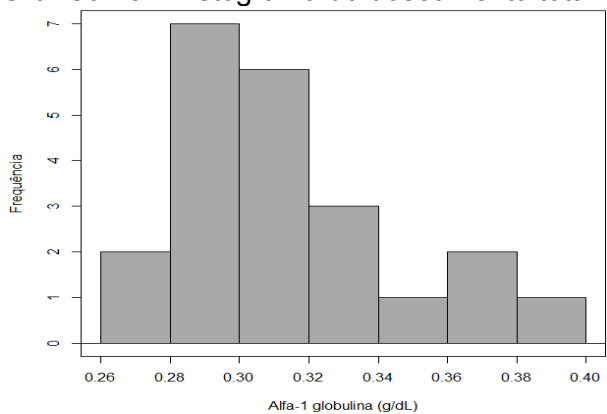
**Gráfico 43 - Histograma do doseamento total de sero-albumina.**



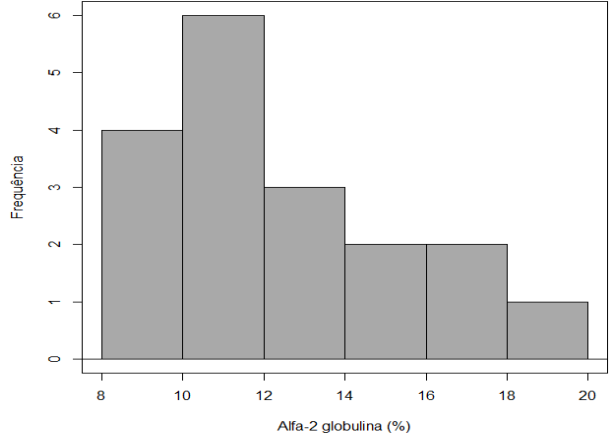
**Gráfico 44 - Histograma do doseamento percentual de alfa-1 globulina.**



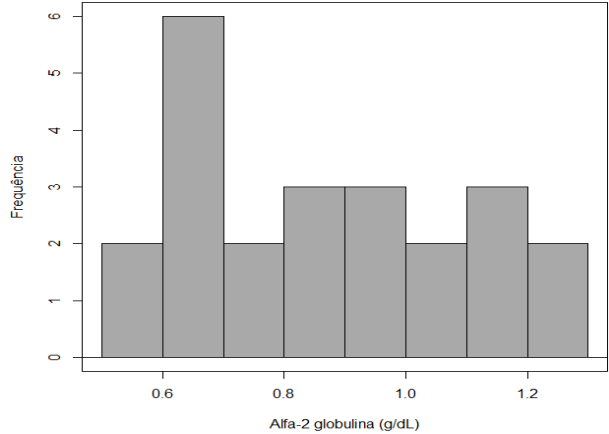
**Gráfico 45 - Histograma do doseamento total de alfa-1 globulina.**



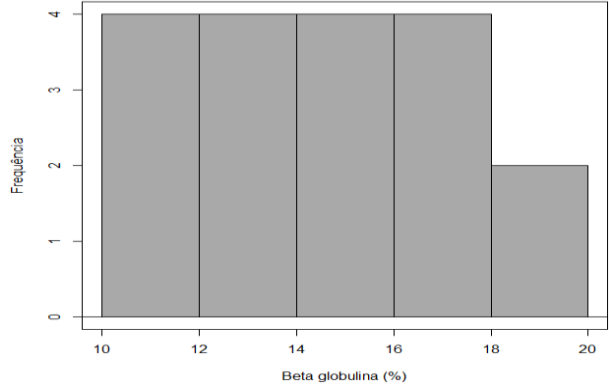
**Gráfico 46 - Histograma do doseamento percentual de alfa-2 globulina.**



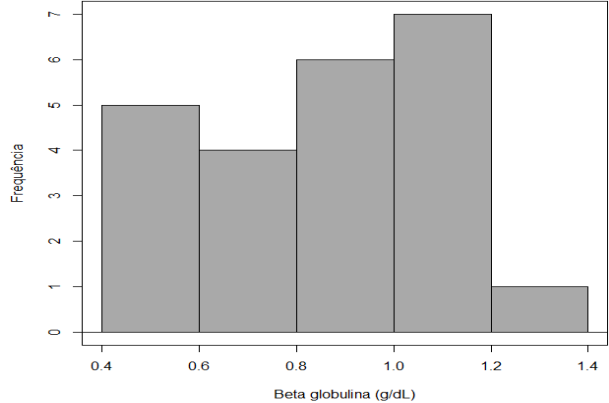
**Gráfico 47 - Histograma do doseamento total de alfa-2 globulina.**



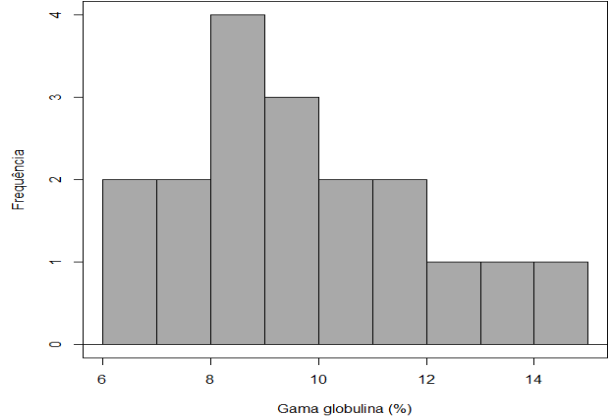
**Gráfico 48 - Histograma do doseamento percentual de beta globulina.**



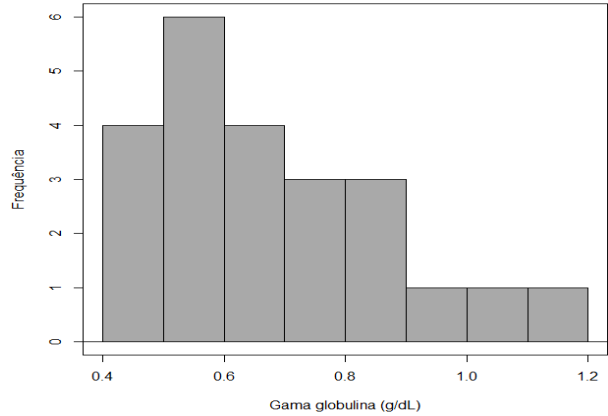
**Gráfico 49 - Histograma do doseamento total de beta globulina.**



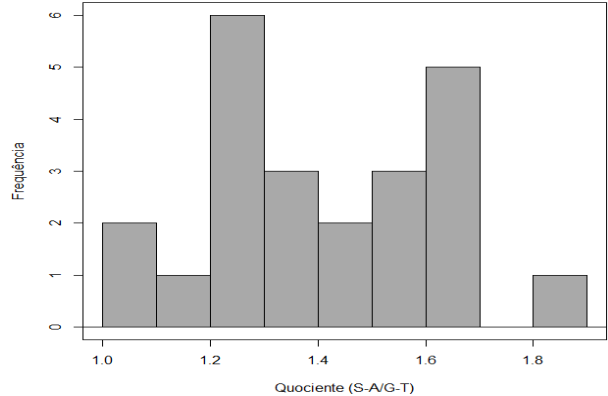
**Gráfico 50 - Histograma do doseamento percentual de gama globulina.**



**Gráfico 51 - Histograma do doseamento total de gama globulina.**



**Gráfico 52 - Histograma do quociente Sero-Albumina/Globulinas totais.**



## ANEXO 6. TABELAS DE VALORES DE PARÂMETROS DO PROTEINOGRAMA

**Tabela 14** - Valores crescentes doseamento de sero-albumina (%).

50,3
51,4
53,9
54,7
54,8
55,6
55,7
57,8
58,0
58,3
59,7
60,2
61,3
62,0
62,3
62,4
62,7
64,6

**Tabela 15** - Valores crescentes doseamento de alfa-1 globulina (%).

4,3
4,5
4,6
4,6
4,7
4,8
4,8
4,9
4,9
5,0
5,0
5,0
5,1
5,2
5,2
5,3
5,5

**Tabela 16** - Valores crescentes doseamento de alfa-2 globulina (%).

8,2
9,6
9,7
9,9
10,1
10,7
11,1
11,2
11,3
11,4
12,6
13,1
13,5
14,9
15,3
16,4
16,6
18,7

**Tabela 17** - Valores crescentes doseamento de beta globulina (%).

10,6
11,1
11,8
12,0
13,0
13,2
13,6
13,7
14,1
15,3
15,3
15,6
16,6
17,1
17,1
17,6
18,1
19,0

**Tabela 18** - Valores crescentes doseamento de gama globulina (%).

6,6
6,7
7,3
7,5
8,3
8,5
8,5
8,7
9,6
9,7
9,9
10,5
10,7
11,2
11,7
12,2
13,6
14,4